

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

LABORATOIRE EA 4708 / I3MTO

THÈSE présentée par :

Masnsen CHERIEF

soutenue le : **15 décembre 2017**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie-Santé

**Comprendre l'Arthrose: Analyse
histomorphométrique de l'unité os-cartilage**

THÈSE dirigée par :

[Hechmi TOUMI]

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

[Prénom NOM]

[Titre, établissement]

[Prénom NOM]

[Titre, établissement]

JURY (*y reporter tous les membres de jury présents à la soutenance*):

[Prénom NOM]
(définitive)

[Titre, établissement], Président du jury (*sur version*)

[Prénom NOM]

[Titre, établissement]

[Prénom NOM]

[Titre, établissement]

[Prénom NOM]

[Titre, établissement]

[Prénom NOM]

[Titre, établissement]

Sommaire

Sommaire	1
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	6
Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	8
I. Epidémiologie.....	9
II. Articulation du genou sain	11
II.1 Le cartilage.....	11
II.1.1 Architecture.....	11
II.1.2 Fonction.....	13
II.2 Os sous chondral.....	13
II.2.1 Architecture.....	13
II.2.2 Fonction.....	14
II.3 Liquide synovial	15
II.3.1 Architecture.....	15
II.3.2 Fonction.....	15
III. Articulation du genou atteint d'arthrose	16
III.1 Aspect Clinique	16
III.1.1 Interrogatoire	16
III.1.2 Imagerie radio	17
III.1.3 Echographie.....	18
III.1.4 Imagerie RM (dégradation cartilage)	18
III.2 Aspect Histologique.....	19
III.2.1 Cartilage	19
III.2.2 Os sous chondral	24
III.3 Aspect en microarchitecture	25

III.4	Aspect Moléculaire	27
III.4.1	Facteurs de l'angiogenèse	27
III.4.2	Facteurs d'Innervation	29
III.4.3	Facteurs d'Inflammation	30
IV.	Rôles de l'os sous-chondral dans l'arthrose.....	32
IV.1	Vascularisation de la plaque sous-chondral	32
IV.2	Epaississement de la plaque sous-chondrale	33
V.	Relation cartilage-Os sous-chondral	34
	Matériels et méthodes.....	36
I.	Population	37
II.	Les tissus articulaires (plateau tibiaux)	37
III.	Régions d'intérêt et prélèvements osseux.....	38
IV.	Histologie.....	38
V.	Immuno-histo-chimie	41
VI.	Expression des ARNm par RT q-PCR.....	41
VI.1	Extraction des ARN totaux.....	41
VI.2	Transcription inverse	42
VI.3	RT-qPCR	42
VII.	Expression des protéines	43
VII.1	Extraction des protéines	43
VII.2	Dot-blot.....	43
VIII.	Microarchitecture osseuse.....	44
IX.	Statistiques	44
	Résultats.....	45
I.	La population.....	46
II.	Histologie.....	46
II.1	Epaisseur ostéo-articulaire	49

II.2	Epaisseur et surface du cartilage hyalin	49
II.3	Epaisseur et surface du cartilage calcifié.....	49
II.4	Epaisseur et surface de l'os sous-chondral	49
II.5	Vascularisation.....	50
III.	Microarchitecture osseuse.....	51
III.1	Microarchitecture de l'os sous-chondral.....	51
III.2	Microarchitecture de l'os trabéculaire	54
IV.	Corrélations	56
IV.1	Correlation entre les paramètres histologiques.....	56
IV.2	Corrélations entre les paramètres histologiques et μ CT.....	57
IV.3	Corrélations entre l'histologie et la microarchitecture de l'os sous-chondral.....	58
IV.4	Corrélations entre l'histologie et la microarchitecture de l'os trabéculaire	59
IV.5	Corrélations entre les paramètres μ CT	60
IV.5.1	Microarchitecture de l'os trabéculaire.....	60
IV.5.2	Microarchitecture de l'os trabéculaire Vs l'os sous-chondral.....	60
IV.5.3	Microarchitecture de l'os trabéculaire.....	61
IV.5.4	Microarchitecture de l'os trabéculaire Vs l'os sous-chondral.....	61
V.	qRT-PCR	63
V.1	Expression de l'ARN messenger VEGF (mVEGF)	63
V.2	Expression de l'ARN messenger PDGF (mPDGF)	63
V.3	Expression de l'ARN messenger NGF (mNGF)	63
V.4	Expression de l'ARN messenger PGP9.5 (mPGP9.5).....	64
VI.	Dot-Blot	66
	Discussion	67
	Conclusion	75
	Bibliographie	78

Liste des figures

Figure 1: Incidence de l'arthrose de la main, hanche et du genou [8]	10
Figure 2: Architecture de l'unité ostéochondrale	12
Figure 3: Reconstruction 3D d'une carotte ostéochondrale, la plaque sous-chondrale est représentée en violet	13
Figure 4: Schéma présentant les changements pathologiques dans l'arthrose. [42].....	24
Figure 5: Les composantes principales d'un scanner μ CT.....	25
Figure 6: Arthroscopie avec la classification d'Outbridge.....	38
Figure 7 : Procédure histologie. Schéma réalisé par RC.....	39
Figure 8: Schéma récapitulatif du protocole expérimental	44
Figure 9: Scoring OARSI réalisé par l'équipe	46
Figure 10: Maintien de l'épaisseur ostéo-chondral sur les différents grades d'arthrose.	47
Figure 11: Mesures histologiques effectuées sur une coupe d'une carotte osseuse colorée en HES. Les mesures sur la surface du cartilage articulaire, surface de l'os sous-chondral et épaisseur de l'os sous-chondral y sont représentées.	47
Figure 12: Résultats des mesures histologiques. Les épaisseurs et surface de sous-chondral, du cartilage calcifié et hyalin sont représentées en fonction du grade OARSI. Dans le coin haut à droite de chaque graphique est affiché le coefficient de corrélation entre le paramètre mesuré et l'échelle OARS	48
Figure 13: Coupe histologique d'une carotte osseuse avec un zoom sur un cône sanguin immunomarcqué au VEGF. Le graphique représente le nombre de cônes par surface en fonction du grade OARSI.....	48
Figure 14: Microarchitecture de l'os sous-chondral. Les graphiques représentent le P.N, P..Vtot, tBS/BV, FD et μ EP en fonction du grade OARSI. Dans le coin haut à droite de chaque graphique est affiché le coefficient de corrélation entre le paramètre mesuré et l'échelle OARSI.	53
Figure 15 : Analyse en Dot blot de marqueurs neurovasculaires et inflammatoire.....	66

Liste des tableaux

Tableau 1 : Régulateurs de l'angiogenèse localisés ou exprimés par les tissus de l'articulation arthrosique	28
Tableau 2: Coefficients de corrélation de Spearman (intervalle de confiance à 95%) entre les paramètres histologiques.....	57
Tableau 3: Coefficients de corrélation de Spearman (intervalle de confiance à 95%) entre les paramètres histologiques et microarchitecture de l'os sous-chondrale.	58
Tableau 4: Coefficients de corrélation de Spearman (intervalle de confiance à 95%) entre les paramètres histologiques et microarchitecture de l'os trabéculaire.	59

Liste des abréviations

OMS : Organisation mondiale de la santé

JSN : Joint space narrowing (pincement articulaire)

JSW: Joint space width (espacement articulaire)

μCT : Micro-computed tomography (micro-tomographie assisté par ordinateur)

NPY : Neuropeptide Y

SP: Substance p

CGRP: Calcitonin gene-related peptide-I

TrkA: Tyrosine kinase récepteur A

NGF: Neuronal growth factor

p75: ou LNGFR low affinity nerve growth factor receptor

PI3 : Phosphatidylinositol-3

CRP : Protéine C réactive

TNF-α: Tumor necrosis factor alpha

IL1-β : Interleukin 1 beta

MMPs: Métalloprotéases

AGE: Advanced glycation end-product

TLR: Toll-like recptor

SASP: Small acid-soluble spore protein

Introduction

I. Épidémiologie

L'arthrose, maladie articulaire dégénérative, est la pathologie articulaire la plus fréquente, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 9.6% des hommes et 18% des femmes âgés de plus de 60 ans ont de l'arthrose[1]. En France, 6 millions de nouveaux patients sont diagnostiqués chaque année. L'arthrose peut être primaire, idiopathique, localisée sur une seule articulation ou généralisée, comme elle peut être secondaire due à un trauma ou à des troubles métaboliques, endocriniens, neuropathiques ou autres. L'arthrose est caractérisée par une perte focale et progressive du cartilage articulaire hyalin accompagnée de modifications de l'os sous-jacent dans un environnement inflammatoire [2].

L'arthrose a récemment été définie comme un trouble impliquant des articulations mobiles caractérisé par un stress cellulaire et une dégradation de la matrice extracellulaire initiée par des micro et macro-blessures qui activent des réponses de réparation inadaptées y compris des voies pro-inflammatoires de l'immunité innée. La maladie se manifeste d'abord comme un dérèglement moléculaire (métabolisme anormal des tissus articulaires), suivi de dérèglements anatomiques et/ou physiologiques (caractérisés par une dégradation du cartilage, un remodelage osseux, une formation d'ostéophytes, une inflammation articulaire et une perte de la fonction articulaire normale) qui peuvent culminer avec une maladie [3]

Les articulations principalement touchées par l'arthrose sont les cervicales et les lombaires (entre 70 et 75 %), le genou (40%), le pouce (30%), la hanche et la cheville (10%) et les épaules (2%)[4]. Les arthroses du genou et de la hanche ne sont pas les plus fréquentes, mais elles restent les plus invalidantes au quotidien. La coxarthrose (arthrose de la hanche) et la gonarthrose (arthrose du genou) symptomatiques touchent respectivement en France 1,9 et 4,7 % des hommes et 2,5 et 6,6 % des femmes [5]

La prévalence de l'arthrose augmente avec l'âge, et est liée au sexe de manière évidente [6, 7]. Avant 50 ans, la prévalence de l'arthrose dans la plupart des articulations est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Après environ 50 ans, les femmes sont plus souvent touchées par l'arthrose de la main, du pied et du genou que les hommes. Dans la plupart des études, l'arthrose de la hanche est plus fréquente chez les hommes [6]. Dans une enquête communautaire, l'incidence et la prévalence de la maladie ont augmenté de 2 à 10 fois de 30 à 65 ans et ont augmenté davantage par la suite [8](Figure 1).

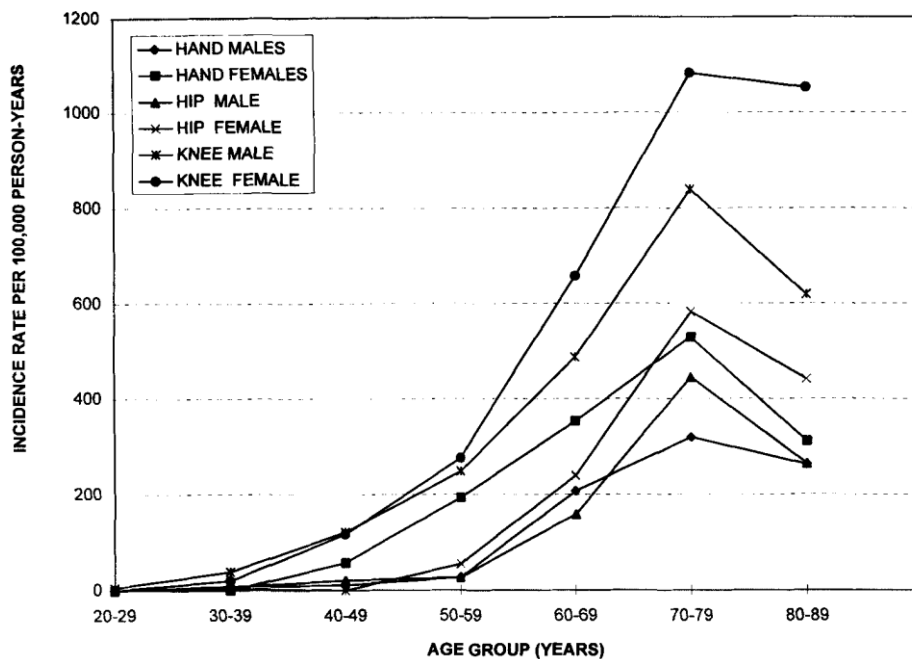


Figure 1: Incidence de l'arthrose de la main, hanche et du genou [8]

Selon l'étude du comté de Fallon, l'incidence de l'arthrose symptomatique est de 100 pour 100 000 personnes années pour la main, 88 pour 100 000 personnes-années pour la hanche et à 240 pour 100 000 personnes années pour le genou. L'incidence de l'arthrose augmente aussi avec l'âge et les femmes semblent être plus sujettes à cette pathologie[8].

Les patients souffrant d'arthrose sont à risque plus élevé de décès par rapport à la population générale. Elle augmente jusqu'à deux fois les risques de décès suite à des pathologies cardiovasculaires ou à la démence. Aux USA, l'arthrose représente environ 6% de tous les décès liés à l'arthrite [9]. De plus, les décès dus à l'arthrose sont probablement très sous-estimés. Par exemple, les hémorragies gastro-intestinales dues à un traitement avec les AINS ne sont pas comptées [9].

Enfin il existe une forte progression en France des coûts de prise en charge de l'arthrose [10]. En 1993, une première évaluation des coûts socio-économiques l'estimait à moins d'1 milliard d'euros. En 2003, ce chiffre est porté à 1,8 milliard d'euros soit une progression de 8% par an.

En 2002, il y a eu 13 millions de consultations, 17 millions de prescriptions médicamenteuses et 5 millions de journées d'arrêt de travail accordées pour la prise en charge de l'arthrose. Cette année-là les coûts directs de l'arthrose représentaient 1,7% des dépenses de l'assurance maladie en France[10].

II. Articulation du genou sain

II.1 Le cartilage

II.1.1 Architecture

Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin de 2 à 4 mm d'épaisseur, c'est un tissu blanc, brillant et lisse. Contrairement à la majorité des tissus, le cartilage articulaire est dépourvu de vaisseaux sanguins, lymphatiques et de fibres nerveuses. Il est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) dense dans laquelle les chondrocytes sont encastrés. La MEC est principalement composée d'eau, de fibres de collagènes, majoritairement de type II, de protéoglycanes ainsi que d'autres protéines non-collagéniques et des glycoprotéines en plus petites quantités. Grâce à cette composition, la MEC retient l'eau qui est nécessaire au maintien des propriétés biomécaniques du cartilage articulaire. Le cartilage articulaire est composé de trois zones, définies par la structure des fibres de collagènes de la MEC ainsi que par la morphologie et la distribution des chondrocytes.

La zone superficielle représente 10 à 20% de l'épaisseur totale de cartilage articulaire. La MEC dans cette zone est principalement composée de fibres de collagène de type II et IX avec la particularité d'être arrangées, serrées et parallèles à la surface articulaire. Le nombre de chondrocytes dans cette zone est relativement plus important et ils ont une morphologie aplatie. La zone superficielle protège les couches plus profondes des contraintes de cisaillement. Elle est en contact avec le liquide de la capsule synoviale qui lui prodigue ces propriétés élastiques et lui permet de résister aux forces de cisaillement, de traction et aux forces de compression imposées par l'articulation.

La deuxième zone est la zone médiale, elle représente 40 à 60% de l'épaisseur totale de cartilage articulaire. La MEC est composée de fibres de collagène de type II plus épaisses et de protéoglycanes. Le nombre de chondrocytes dans cette zone est moins important et ils ont une forme sphérique. Cette zone permet un lien fonctionnel et anatomique avec la zone superficielle, elle est aussi, grâce à sa composition en fibre de collagène épaisse, le premier front de résistance aux forces de compression.

La troisième zone est la zone profonde, elle représente 30% du volume total du cartilage articulaire. Dans cette zone, la MEC contient les fibres de collagènes de type II les plus épaisses avec une disposition radiale. On y retrouve la plus haute concentration en protéoglycanes et la plus basse concentration en eau comparées aux deux autres zones. Les chondrocytes y sont typiquement arrangés sous forme de colonnes, parallèles aux fibres de collagènes et perpendiculaires à la surface articulaire. Cette zone fournit la plus grande résistance aux forces de compression.

La couche calcifiée qui se situe à l'interface de la couche profonde et de l'os sous-chondral, joue un rôle essentiel en assurant la transition du cartilage à l'os, en ancrant les fibrilles de collagène de la zone profonde de l'os sous-chondral. Dans cette zone, la population cellulaire est rare et les chondrocytes sont hypertrophiques.

Ces deux dernières zones sont séparées par une ligne discrète appelée : la tidemark. Cette ligne sépare la plaque osseuse sous-chondrale du cartilage articulaire. La tide-mark est une fine couche protéique basophile, ondulée et complexe, formée par un enchevêtrement très élevé et dense de fibres de collagène. Cette ligne représente le front de minéralisation du cartilage calcifié et assure une transition progressive entre le cartilage articulaire hyalin non calcifié et le cartilage calcifié, qui sont deux régions bien définies [11].

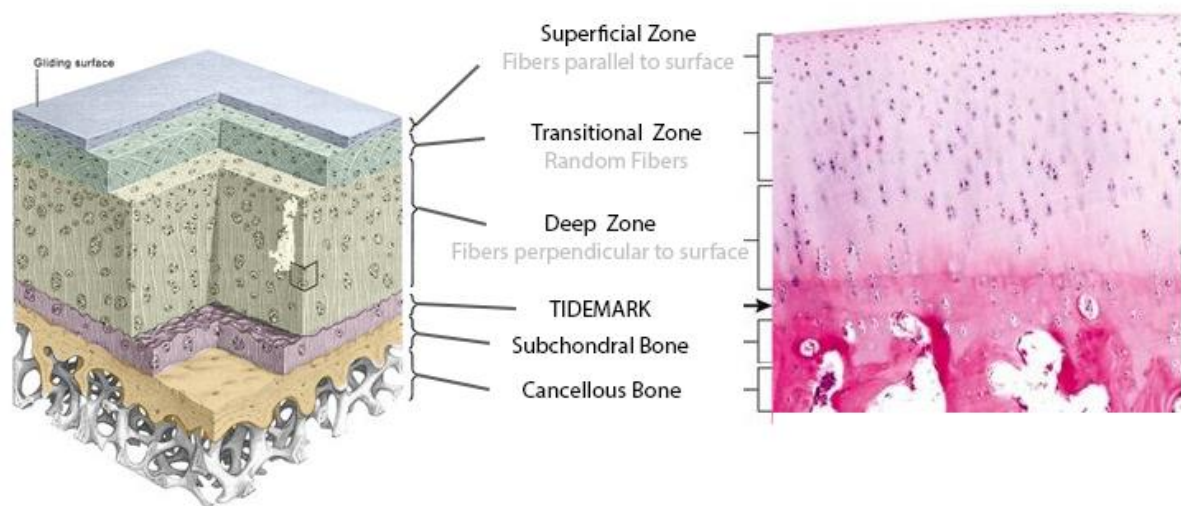


Figure 2: Architecture de l'unité ostéochondrale

II.1.2 Fonction

Le cartilage articulaire, comme défini plus haut, est une mince couche de tissu conjonctif spécialisé avec des propriétés viscoélastiques uniques. Sa fonction principale est de fournir une surface lisse et lubrifiée à l'articulation, diminuant les frottements et facilitant la transmission des charges à l'os sous-chondral sous-jacent. Le cartilage articulaire est unique dans sa capacité à résister à des charges cycliques élevées, avec peu ou pas de dommages ou de modifications dégénératives [12, 13]. Les fonctions biomécaniques remplies par le cartilage articulaire sont assurées par la phase aqueuse du cartilage, 80% d'eau dans le cartilage hyalin, et par la MEC, riche en protéoglycanes, poreuse et perméable aux mouvements de fluide. Quand des forces de contacts sont appliquées sur le cartilage articulaire, la pression du liquide interstitiel de la MEC augmente et s'écoule en dehors de la MEC, une fois les forces disparues le liquide interstitiel reflue vers la MEC. C'est grâce à ces propriétés viscoélastiques que le cartilage articulaire remplit ses fonctions biomécaniques en diminuant les frictions et en répartissant les charges supportées par l'articulation.

II.2 Os sous chondral

II.2.1 Architecture

La région de l'os sous-chondral peut être définie de différentes manières. Certains auteurs la désignent comme étant l'ensemble des tissus calcifiés sous-jacents à la Tidemark ; ou bien comme étant la mince lamelle corticale radiologiquement visible directement sous l'espace articulaire ; ou encore comme l'os trabéculaire dense immédiatement adjacent à la corticale lamellaire ; et enfin comme une combinaison de tout le tissu subarticulaire total [14]

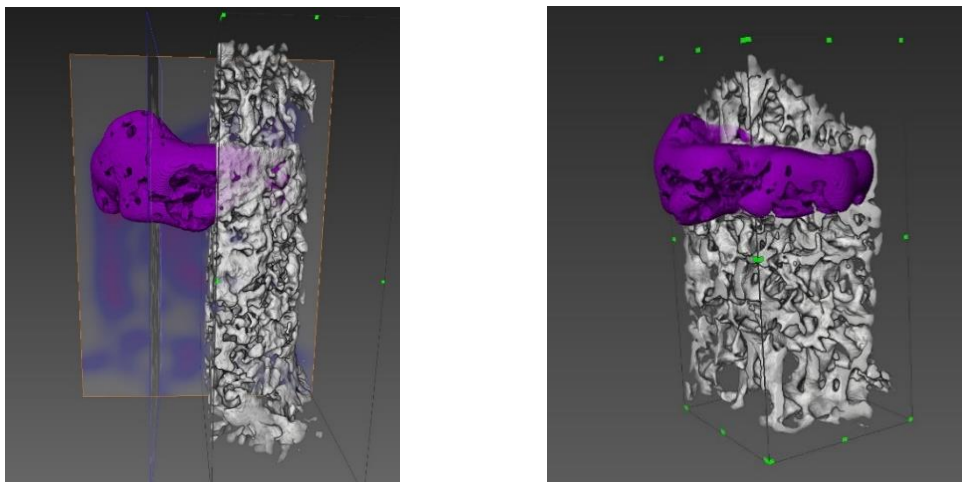


Figure 3: Reconstruction 3D d'une carotte ostéochondrale, la plaque sous-chondrale est représentée en violet

Duncan a défini la « plaque sous-chondrale » comme une zone qui sépare le cartilage articulaire de l'os trabéculaire, et qui est constituée de deux couches : d'une région calcifiée du cartilage articulaire et d'une couche d'os lamellaire [15]. En effet, la plaque osseuse sous-chondrale est généralement définie par deux couches minéralisées qui forment une seule unité. La première couche, située immédiatement au-dessous du cartilage calcifié, est une plaque épaisse de 1 à 3 mm d'os cortical qui est physiologiquement et mécaniquement similaire à l'os cortical dans d'autres endroits du squelette, mais un peu moins rigide que la corticale diaphysaire. La seconde couche est l'os spongieux sous-chondral qui est plus poreux, métaboliquement actif et à un volume, une densité et une rigidité plus faibles que la plaque corticale [14]. Il est très important de faire la distinction entre ces deux couches à cause des différents changements métaboliques et structuraux qui les affectent au cours de l'évolution de l'arthrose. L'os trabéculaire peut augmenter sa rigidité et sa force en changeant sa structure et l'os sous-chondral s'épaissir pour résister à un chargement plus élevé en raison de la perte de cartilage [16].

II.2.2 Fonction

L'os sous-chondral est une composante dynamique de l'articulation et, pour autant que l'on sache, l'une de ses fonctions principales est de fournir un appui pour le cartilage articulaire. L'os sous-chondral absorbe la majeure partie de la force mécanique appliquée à l'articulation. De par sa nature dynamique, l'architecture de l'os sous-chondral s'adapte en fonction des chocs et des stress mécaniques appliqués à l'articulation. Le cartilage et l'os sous-chondral agissent donc de concert pour remplir les fonctions de soutien mécanique au niveau de l'articulation. Le cartilage agit comme un plateau recevant et distribuant les forces de pression sur toute sa surface et l'os sous-chondral comme une poutre structurelle et amortisseur soutenant la majeure partie des forces appliquées sur l'articulation. En considérant ces deux éléments et leurs liens, il a émergé l'idée que l'arthrose n'est pas uniquement une maladie du cartilage. Chacun de ces tissus, cartilage articulaire et os sous-chondral, sont au niveau anatomique étroitement liés et nous pensons que toute modification affectant les propriétés mécaniques de l'un influera sur l'autre.

II.3 Liquide synovial

II.3.1 Architecture

Le liquide synovial sain est clair, jaune pâle, visqueux, et ne coagule pas [17]. Des études sur du liquide synovial de différents mammifères ont montré des similitudes considérables entre les espèces, bien que des différences notables existent [18]. La majorité des travaux d'investigation pour déterminer la composition du liquide synovial a été effectuée sur le liquide synovial bovin principalement parce que de grandes quantités de celui-ci sont disponibles [19].

Le liquide synovial est un plasma modifié sécrété par les tissus articulaires. La différence majeure entre le liquide synovial et d'autres fluides corporels dérivant du plasma est la teneur élevée en acide hyaluronique (mucine). La source exacte de l'acide hyaluronique fait toujours l'objet de débat. Il est généralement admis que ce sont les fibroblastes de la membrane synoviale et les cellules de la membrane synoviale qui produisent ce mucopolysaccharide constituant du liquide synovial. L'acide hyaluronique est un polysaccharide non sulfaté composé de quantités équimolaires d'acide D-glucuronique et des résidus N-acétyl-D-glucosamine. La viscosité du liquide synovial normale est due à cette acide hyaluronique.

II.3.2 Fonction

Deux fonctions principales sont attribuées au liquide synovial 1) participer à la fonction mécanique des articulations par la lubrification des surfaces articulaires [20, 21], et 2) faciliter la nutrition du cartilage articulaire en agissant comme un moyen de transport pour les substances nutritionnelles, telles que le glucose[22].

III. Articulation du genou atteint d'arthrose

III.1 Aspect Clinique

III.1.1 Interrogatoire

La première étape du diagnostic de l'arthrose passe par un interrogatoire conduit par le médecin dont le but est de préciser l'anamnèse des troubles ressentis par le patient. Le médecin définit l'historique de la maladie, date de début des troubles, évolution dans le temps, si un traitement est engagé ou non et les éventuels résultats. Le but est d'essayer de déterminer le ou les facteurs déclenchants et d'éventuels traumatismes. Les antécédents personnels et familiaux sont aussi recherchés, tout comme d'éventuels actes médicaux ou chirurgicaux sur l'articulation. La profession du patient est une information importante pour le diagnostic de l'arthrose tout comme les loisirs pratiqués. Des signes plus généraux comme la fièvre, une asthénie, un amaigrissement et une perte d'appétit peuvent aider le praticien à poser un diagnostic

Concernant l'articulation du genou, les signes fonctionnels recherchés sont :

- la douleur, en précisant son siège, son intensité, la zone d'irradiation, le type mécanique ou inflammatoire,
- l'impotence fonctionnelle, la limitation douloureuse de la mobilité, une gêne dans les gestes du quotidien ; la réduction du périmètre de marche, les douleurs lors de la montée ou de la descente d'escaliers, ou d'accroupissement,
- l'instabilité, les épisodes de dérobement du genou avec chute possible, les sensations d'appréhension et d'insécurité à l'appui, elle peut être due à des insuffisances ligamentaires et/ou musculaires, ou bien être la conséquence des douleurs : inhibant les muscles stabilisateurs du genou,
- les blocages d'origine méniscale ou rotulienne. Ils vont limiter l'amplitude d'extension sans atteindre la flexion. Le blocage méniscal est dû à une déchirure en anse de seau du ménisque qui s'interpose entre la partie antérieure du condyle fémoral et le tibia. Les blocages peuvent aussi être dus à des débris d'os ou de cartilage à l'intérieur de la capsule articulaire. Le blocage rotulien est plus souvent dû à un accrochement après contact des surfaces du cartilage articulaire, ce type de blocage est considéré comme un pseudo-blocage car fugace et disparaît après quelques mouvements de l'articulation.

L'impotence fonctionnelle engendrée par l'arthrose peut être mesurée en utilisant l'Indice algo-fonctionnel de Lequesne ou bien l'index de sévérité symptomatique de l'arthrose des membres inférieurs WOMAC. Dans les deux cas le patient doit répondre à une série de question en les cotant de 0 à 4 pour le WOMAC et de 0 à 2 pour le Lequesne. Plus le score est important plus les répercussions fonctionnelles de l'arthrose sont importantes.

En plus des troubles fonctionnels, des signes physiques sont détectables sur les patients atteints d'arthrose. Des boiteries et épanchements articulaires (kyste poplité) peuvent exister ainsi qu'une réduction des amplitudes articulaires et de la mobilité de la patella. A la palpation du patient, des douleurs au niveau de l'interligne fémoro-tibiale ou des facettes rotuliennes peuvent aussi être détectées.

III.1.2 Imagerie radio

La radiographie est la technique d'imagerie de référence utilisée pour le diagnostic de l'arthrose. En effet c'est la modalité d'imagerie la moins cher. Grâce à la radiographie, les cliniciens sont en mesure de détecter la plupart des modifications osseuses telles que les ostéophytes, la sclérose sous-chondrale et les kystes [23]. La dégradation du cartilage ainsi que l'intégrité du ménisque peuvent également être vue, indirectement par la mesure de la largeur de l'espace articulaire (JSW : Joint Space Width). L'évolution de l'arthrose est contrôlée par radiographie. La mesure de l'interligne articulaire (JSN : Joint Space Narrowing) est une information clé pour déterminer l'aggravation ou l'amélioration de l'arthrose. Quand une perte totale de JSN avec une apparence d'os sur l'os est observée, un remplacement articulaire est alors le plus recommandé pour traiter le patient.

Sur la base de la radiographie, une évaluation semi-quantitative de la sévérité de l'arthrose peut être effectuée par le système de classement Kellgren et Lawrence (KL) qui se base sur la formation d'ostéophytes et la diminution du JSN [24]. Néanmoins, le classement KL a montré des limites comme par exemple le grade trois sur l'échelle KL rassemble les patients avec des pincements modérés jusqu'aux patients affichant un contact os-os. De plus l'évolution de l'arthrose n'est pas la même chez tous les patients et l'échelle KL manque de sensibilité pour les patients avec un phénotype atrophique de l'arthrose du genou où la formation d'ostéophytes n'est pas associée à l'évolution de l'arthrose [25].

Les images radiographiques peuvent également fournir une évaluation quantitative de l'arthrose. Sur la base du pincement mesuré sur une image radiographique du genou, il a été

démontré par traitement d'image que la progression de l'arthrose pouvait être détectée. [26]. Néanmoins, les données extraites de ce genre d'analyse d'image sont sensibles au degré de progression de l'arthrose, la durée de la période de suivi et le protocole de positionnement du genou [27]. Grâce au développement de la radiographie numérique munie de capteurs à rayons X de plus en plus sensibles, l'utilisation du traitement de l'image radiographique sur l'arthrose du genou est devenue plus fiable. Même si la radiographie est la technique la plus utilisée, elle manque de sensibilité et de spécificité. En effet la détection des lésions des tissus conjonctifs, l'analyse du cartilage articulaire, du ménisque, des ligaments, de la moelle osseuse, les modifications synoviale / dommages [28] et d'autres caractéristiques telles que l'invasion neurovasculaire ne peuvent être évaluées via la radiographie standard [27, 29].

III.1.3 Echographie

L'échographie permet une imagerie en temps réel et multiplanaire à un coût relativement faible. Elle offre, sans administration ou exposition aux rayonnements X, ni aux produits de contraste, une évaluation fiable des caractéristiques associées à l'arthrose, y compris les anomalies inflammatoires et structurelles [30]. L'échographie présente cependant certaines limites. En effet, c'est une technique opérateur-dépendante et les propriétés physiques du son limitent sa capacité à évaluer les structures articulaires profondes et l'os sous-chondral.

Dans l'arthrose, le principal avantage de l'échographie sur la radiographie conventionnelle est la capacité à détecter la pathologie synoviale. Grâce à l'évolution de cette technologie et aux nouvelles générations d'échographe, il est maintenant possible de détecter des altérations des tissus articulaires telles que l'hypertrophie synoviale, l'augmentation de la vascularisation et la présence de liquide synovial dans les articulations touchées par l'arthrose [30]. L'échographie a également été utilisée pour évaluer les caractéristiques de l'arthrose du genou et de la hanche. Une étude multicentrique européenne transversale de 600 patients souffrant d'arthrose du genou a démontré que le statut inflammatoire de ces patients était linéairement corrélé à la douleur ressentie au niveau du genou, renforçant le lien entre la synovite et la douleur du genou atteint d'arthrose[31]. Ce lien a aussi été montré par une autre équipe en utilisant cette fois-ci une IRM [32].

III.1.4 Imagerie RM (dégradation cartilage)

L'IRM a apporté une meilleure compréhension de la gonarthrose car elle permet d'imager l'ensemble des tissus de l'articulation. Cette technique d'imagerie est couramment utilisée pour suivre le développement de l'arthrose du genou. L'IRM apporte aux chercheurs un

aperçu plus large sur les modifications associées à l'arthrose dans l'ensemble de l'articulation, et plus particulièrement sur les tissus mous qui ne peuvent être vus par radiographie standard. Les modifications / dommages sur l'os sous-chondral comme les œdèmes, les lésions de la moelle osseuse, les kystes osseux et l'attrition osseuse sous-chondrale ne sont détectés que par IRM. Il a également été démontré grâce à l'IRM que le pincement articulaire mesuré par radiographie affecte non seulement le cartilage, mais aussi les ménisques [33]. L'IRM permet également de détecter l'arthrose chez les personnes qui ne présentent ni symptômes cliniques, ni preuves radiologiques, grâce à l'image de l'état global de l'articulation[29]. Étant donné que les modifications de l'os sous-chondral sont visibles sur l'IRM avant leur apparition sur les radiographies, l'IRM pourrait être une technique fiable pour détecter précocement l'arthrose [34].

Le développement de l'arthrose (premiers stades d'évolution) est associé à une augmentation de l'activité angiogénique. En effet il a été observé une invasion de l'os sous-chondral par des vaisseaux sanguins [35]. Même si avec l'IRM il est possible de détecter les canaux vasculaires au sein de la plaque de croissance et les modifications de la vascularisation [36], elle n'a jamais été utilisée pour suivre l'invasion vasculaire de l'os sous-chondral lors de la progression de l'arthrose.

III.2 Aspect Histologique

III.2.1 Cartilage

Macroscopiquement, le cartilage arthrosique est souvent jaunâtre ou brunâtre, il reste souple, mais souvent enflé. La surface articulaire est rugueuse dans les premiers stades puis la fibrillation tissulaire se manifeste accompagnée enfin de la perte de la matrice (stades avancés) jusqu'à ce que la plaque osseuse sous-chondrale soit totalement dénudée. Même si ces changements macroscopiques peuvent être vus et classés radiologiquement, l'histologie permet une visualisation plus détaillée de ces modifications. Il est ainsi possible d'observer l'irrégularité de la surface articulaire qui est un signe d'arthrose débutante, mais aussi les fissures et ruptures tout comme la perte de la MEC, jusqu'à la dénudation totale de l'os sous-chondral, qui sont des signes d'arthrose avancée.

Le système de classement le plus couramment utilisé (avec des modifications mineures) est le système de classement histochimique-histologique par Mankin et ses collègues en 1971 [37, 38]. Le score Mankin montre une variabilité interindividuelle élevée, cela pourrait être lié au

fait que les observateurs inclus dans son étude n'aient pas reçu la même formation. Cependant, certaines des sous-catégories du système de Mankin ne sont pas pertinentes. Par exemple, la présence d'ostéophytes est présentée par Mankin comme étant une dégénérescence du cartilage primaire, mais en réalité il s'agit d'une formation secondaire.

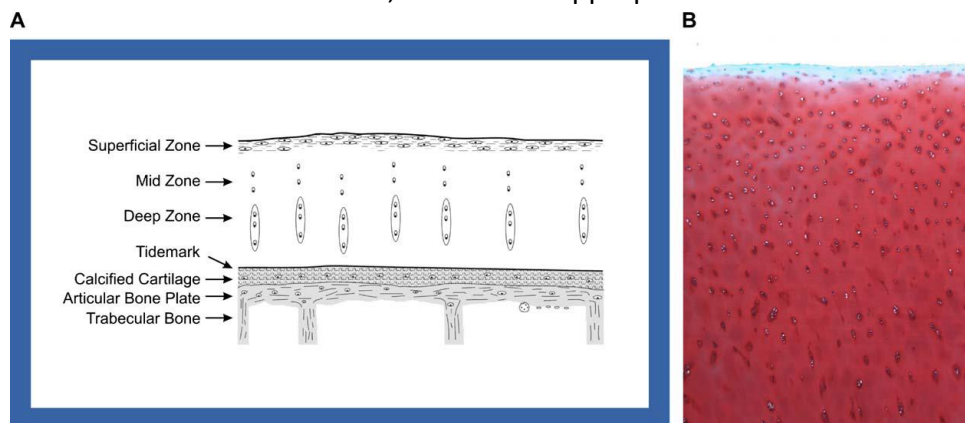
Un autre système de classement largement utilisé est celui d'Outerbridge [39]. Le système Outerbridge a été décrit, au début, pour les atteintes de la rotule. Par la suite, il a été appliqué avec succès à d'autres articulations. Cependant, le système Outerbridge ne se base que sur une observation macroscopique de la surface articulaire [40].

Il est évident qu'un système de classement de l'arthrose basé sur une observation macroscopique n'est pas assez précis lors d'études scientifiques. C'est pour cela que *Pritzker et al* ont proposé un nouveau système de classement de l'arthrose combinant les aspects histopathologiques et cliniques en caractérisant les différentes lésions tissulaires. Il propose une échelle de score arthrosique composée de 6 grades [41].

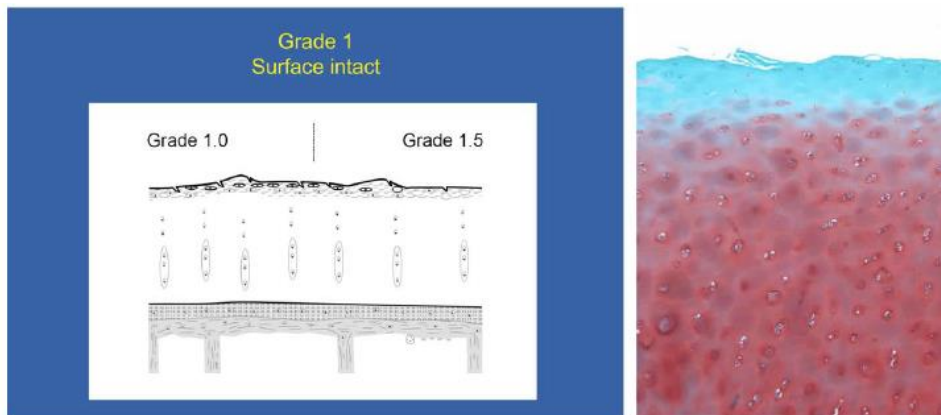
Le cartilage sain/normal est grade 0, les grades de 1 à 4 impliquent des modifications du cartilage articulaire seulement, alors que les grades 5 et 6 concernent l'os sous-chondral. Les caractéristiques morphologiques distinctives entre les six grades sont les suivantes :

Grade 0 : Matrice: surface intacte (architecture normale)

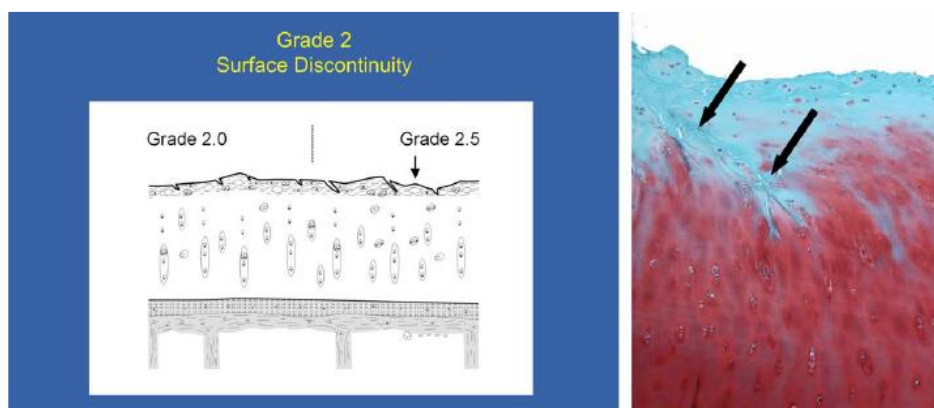
Cellules: intactes, orientation appropriée



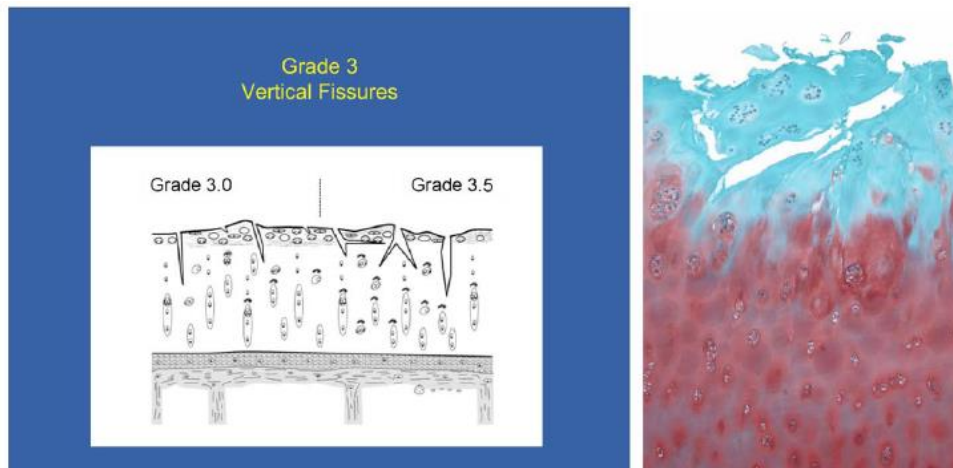
Grade 1 : Matrice : zone superficielle intacte, œdème et/ou fibrillations superficielles, condensation focale de la matrice superficielle
 Cellules: la mort cellulaire, la prolifération (formation de cluster), hypertrophie



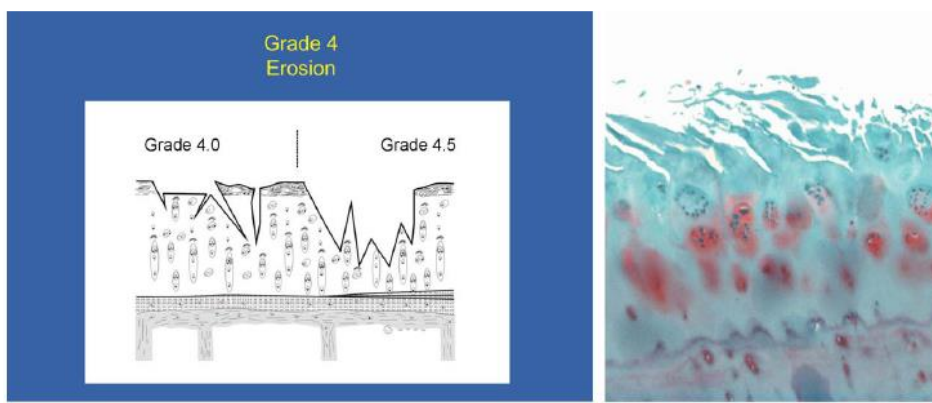
Grade 2 : en plus des altérations du Grade 1, on retrouve :
 Matrice : discontinuité à la zone superficielle (fibrillation profonde)
 ± Perte coloration de protéoglycanes dans le tiers supérieur du cartilage
 ± Augmentation de la coloration des protéoglycanes dans la zone médiale
 ± Désorientation de colonnes des chondrons



- Grade 3 : en plus des altérations du Grade 2, on retrouve :
- Matrice : fissures verticales et ramifiées dans la zone médiane
 - ± Décoloration des protéoglycanes dans les deux tiers inférieurs du cartilage
 - ± Nouvelles cellules à collagène : mort cellulaire, régénération, hypertrophie du cartilage près des fissures



- Grade 4 : en plus des altérations du Grade 3, on retrouve :
- Perte de cartilage avec le délaminage de la zone superficielle
 - Excavation avec la perte de matrice à partir de la zone médiane
 - ± Formation de kystes dans la couche intermédiaire

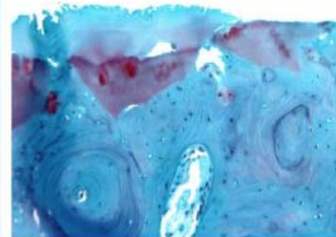
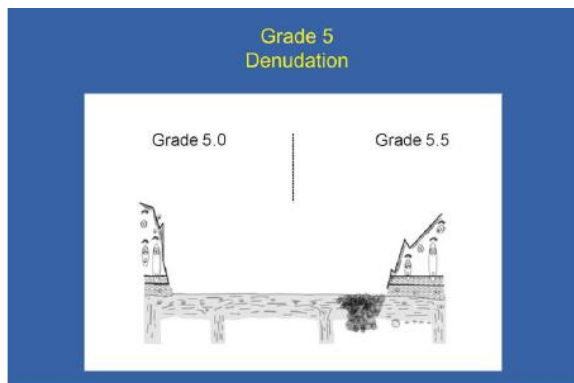


Grade 5 : en plus des altérations du Grade 4, on retrouve :

Altérations de l'os sous-chondral

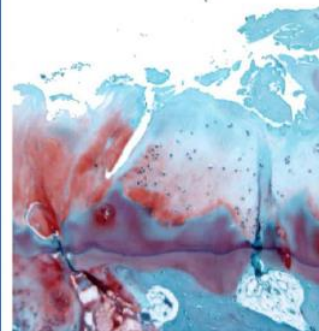
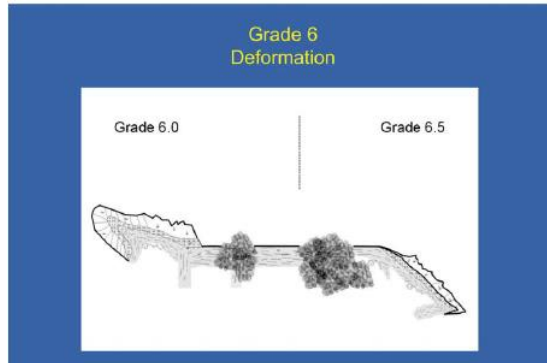
Perte complète du cartilage avec la dénudation de l'os sous-chondral
ou du fibrocartilage

± Microfracture avec remodelage limitée à la surface de l'os



Grade 6 : en plus des altérations du Grade 4, on retrouve :

Remodelage osseux important (en plus de la formation d'ostéophytes)
avec microfracture, fibrocartilage.



A l'heure actuelle, il existe de nombreux termes différents pour décrire le même phénomène histologique (fissures, cracks, déchirures ...). Le travail fourni par Pritzker est d'une importance cruciale car l'utilisation d'une nomenclature commune et unifiée est indispensable pour décrire et comparer les résultats de différentes études menées sur le cartilage arthrosique.

III.2.2 Os sous chondral

Aux premiers stades de l'arthrose, l'interface os sous-chondral/cartilage articulaire est remodelée, en particulier dans les zones sous-jacentes aux régions lésées du cartilage articulaire. Des ostéophytes apparaissent à la connexion du cartilage articulaire avec le périoste et la plaque sous-chondrale s'épaissit à cause d'une prolifération osseuse accrue.

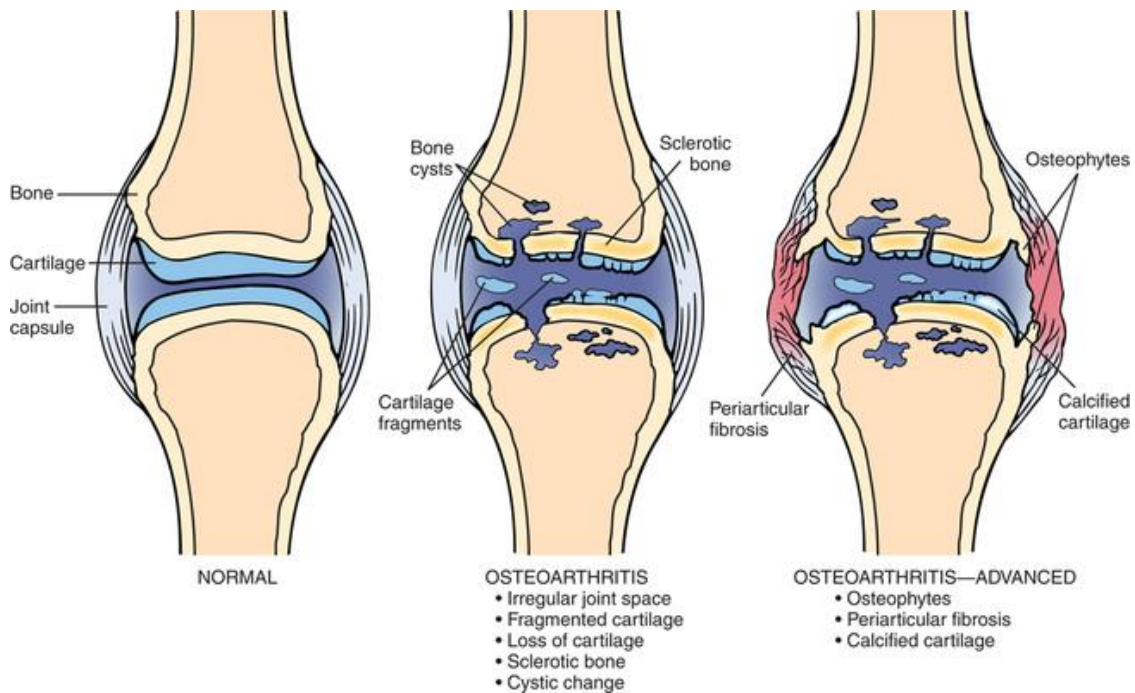


Figure 4: Schéma présentant les changements pathologiques dans l'arthrose. [42]

Pritzker décrit les modifications histologiques de l'os sous-chondral à partir de son grade 5. Le cartilage hyalin est complètement érodé et la surface articulaire est complètement dénudée et laisse apparaître les parties calcifiées du cartilage et l'os sous-chondral. A noter, que même si la plaque sous-chondrale est plus épaisse sous les zones dénudées, elle est néanmoins moins minéralisée que l'os trabéculaire sous-jacent [43].

Le défaut de minéralisation peut causer l'apparition de microfracture à travers la plaque sous-chondrale entraînant des réponses métaboliques de réparations produisant du fibrocartilage. Chez certains patients, le fibrocartilage peut croître et recouvrir les surfaces articulaires dénudées du cartilage hyalin. Chez d'autres patients, on peut aussi retrouver des crêtes d'os nouvellement formées recouvrant les surfaces dénudées [41].

Lorsque des déformations du contour de la surface articulaire sont observées, on considère que la pathologie s'est aggravée. Ces déformations du contour de la surface articulaire sont dues aux fractures qui se forment dans la plaque osseuse, qui sont accentuées par

l'augmentation de l'activité métabolique autour de ces fractures, cumulées à l'activation des tissus connectifs ostéoarticulaires [44].

Les tentatives de réparations des zones érodées débouchent sur la formation de fibrocartilage qui est exacerbée par une activation inflammatoire des tissus connectifs, ensemble ces processus favorisent la formation d'ostéophytes aux marges de l'articulation. Des ostéophytes peuvent croître au milieu de l'articulation, et sont caractéristiques du grade 6 défini par Pritzker.

III.3 Aspect en microarchitecture

La micro-tomographie assistée par ordinateur (micro-computed tomography, microCT ou μ CT) est un outil d'imagerie non destructif pour la production d'images tridimensionnelles (3D) à haute résolution. Ces images sont composées de projections transaxiales bidimensionnelles (2D) ou de «tranches» d'un spécimen cible. L'équipement μ CT se compose de plusieurs composantes principales : le tube à rayons X, le filtre à rayonnement et le collimateur (qui focalise le faisceau sur une projection), et un capteur CCD recouvert de phosphore qui convertit les rayons X en lumière visible (Figure 5).

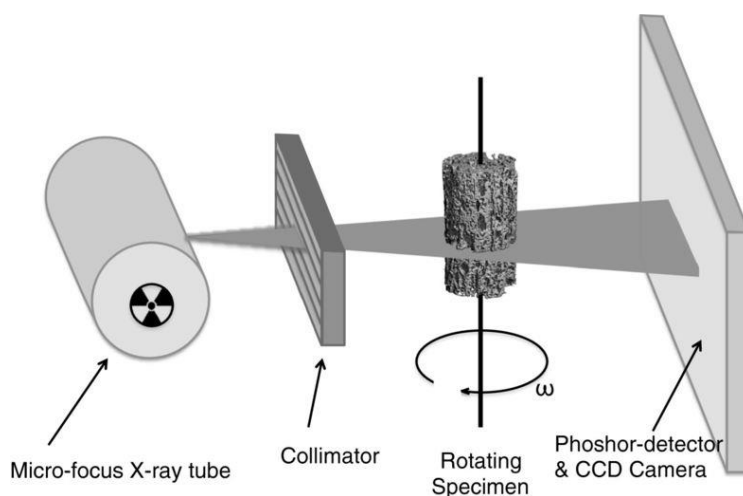


Figure 5: Les composantes principales d'un scanner μ CT

La reconstruction d'une image 3D est réalisée en tournant soit l'échantillon (pour les systèmes de bureau, notre cas), soit l'émetteur et le détecteur (pour l'imagerie animale en direct) pour générer une série de projections 2D qui seront reconstruites numériquement en 3D en [45, 46]. Cette modalité d'imagerie non destructive peut produire des images 3D et des cartes 2D avec des voxels approchant $1\ \mu\text{m}$, ce qui lui donne une résolution supérieure à d'autres techniques telles que l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) [45].

Le principe de fonctionnement du μ CT repose sur l'atténuation des rayons X traversant l'objet ou l'échantillon qui est scanné. Au fur et à mesure qu'un rayon X traverse un tissu, l'intensité du faisceau de rayons X incident diminue selon l'équation, $I_x = I_0 e^{-\mu x}$, où I_0 est l'intensité du faisceau incident ; x est la distance de la source, I_x est l'intensité du faisceau à la distance x de la source, et μ est le coefficient d'atténuation linéaire [3]. L'atténuation dépend donc à la fois du matériau de l'échantillon et de l'énergie source et peut être utilisée pour quantifier la densité des tissus à imager.

Grâce à cet outil, il a été montré que la résistance des os varie avec le compartiment du genou et la profondeur de la surface de l'articulation, que l'os trabéculaire répond à la charge avec, au moins, un changement au niveau de la densité minérale osseuse [47]. D'autres progrès technologiques ont rendu possible l'évaluation de la structure osseuse 3-D [48]. La corrélation entre structure et force de l'os a également été démontrée [49]. De plus, le μ CT s'est révélé efficace, non destructif et précis [50, 51]. L'imagerie μ CT a aussi permis d'évaluer des changements structuraux dans l'arthrose (OA). Dans un modèle de cochon d'Inde d'OA avancé, évalué avec CT, une perte initiale de la fraction volumique trabéculaire et l'amincissement trabéculaire ont été suivis d'une augmentation de la fraction volumique trabéculaire et de l'épaississement des trabécules [52]. Dans un modèle canin, il a été montré que dans l'OA, l'épaisseur de l'os sous-chondral a augmenté et l'épaisseur trabéculaire a diminué [53]. Ding et al. ont également montré dans une étude sur le tibia humain que la qualité osseuse trabéculaire et les propriétés mécaniques se détériorent dans OA [54].

Il est maintenant bien reconnu que l'arthrose est une pathologie qui touche l'ensemble des tissus de l'articulation et que l'os sous-chondral joue un rôle prépondérant dans l'évolution de la pathologie. Cependant, la plupart des études sur l'arthrose ainsi que les méthodes de diagnostic se concentrent majoritairement sur les altérations du cartilage articulaire. Par conséquent, il existe un réel manque d'information sur l'impact des modifications morphométriques sur l'évolution de la pathologie. L'analyse morphométrique de l'os comprend l'analyse de l'os trabéculaire et cortical (sous-chondral pour nous). Les paramètres architecturaux sont basés directement sur les données d'image 3D. Les paramètres importants comprennent le volume relatif de l'os (BV / TV), l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) ou l'épaisseur corticale (Ct.Th) qui sera l'épaisseur sous-chondrale pour nous (Esc), la séparation trabéculaire et le nombre (Tb.Sp, Tb.N), le rapport surface / volume (BS / BV) et le facteur de structure trabéculaire [55] (Tb.Pf) - ce dernier peut être calculé en 2D ou 3D. D'autres

paramètres ont été développés à partir de l'analyse μ CT de l'os et sont des quantités en 3D et n'ont pas d'équivalent en histomorphométrie à 2D. Il s'agit notamment de l'indice de modèle de structure (SMI) qui indique la prévalence relative des plaques et des tiges dans l'os trabéculaire, des indices de connectivité trabéculaire, y compris le calcul 3D du facteur de motif trabéculaire (Tb.Pf) [56], et la dimension fractale (FD) donnant des informations sur le degré de complexité ou de désordre de la microarchitecture osseuse [57]

III.4 Aspect Moléculaire

III.4.1 Facteurs de l'angiogenèse

L'os sous-chondral est un tissu riche en vaisseaux sanguins et en nerfs qui peuvent s'étendre jusqu'au cartilage calcifié. La présence de vascularisation au-dessus du cartilage calcifié, i.e. dans le cartilage articulaire non-calcifié et les ostéophytes est un signe caractéristique de l'arthrose [35]. Cette présence de vaisseaux sanguins dans le cartilage articulaire peut être due à un déséquilibre entre les facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques. Une étude sur un modèle d'embryon de poule met en évidence la perte de la résistance du cartilage articulaire à l'invasion vasculaire [58]. Il a aussi été montré que les chondrocytes hypertrophiques résidant dans les couches profondes du cartilage articulaire produisent des facteurs angiogéniques [59]. Donc on peut imaginer que, lorsque la tidemark est endommagée, les facteurs angiogéniques diffusent plus facilement dans la matrice du cartilage et influencent la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins. Le liquide synovial provenant de patients atteints d'arthrose contient une large variété de facteurs angiogéniques capables de stimuler la vascularisation[60].

TABLE 1. Angiogenesis regulators localized to or released within osteoarthritic human synovium, synovial fluid and articular chondrocytes

Stimulators		Inhibitors	
Synovial fluid/synovium	Articular chondrocytes	Synovial fluid/synovium	Articular chondrocytes
Bradykinin*	SP [36]	Thrombospondin*	Thrombospondin [57]
SP*	PGE ₂ [37]	Interferon- γ *	Leukaemia inhibitory factor [58]
CGRP*	Nitric oxide [38]	Leukaemia inhibitory factor*	Tissue inhibitors of MMP-1 and -2 [59]
Angiotensin II*	Histamine [39]	Tissue inhibitors of	TGF- β [44]
PGE ₂ *	VEGF _{121/189} [15]	MMP-1 and -2 [49]*	TNF- α [45]
Nitric oxide*	Endoglin [40]	TGF- β [19]*	Chondrocyte inhibitor of
Histamine*	Hepatocyte growth	TNF- α [20]*	angiogenesis [60]
VEGF _{121/189} [15]*	factor [41]	Angiopoietin-2 [16]*	Chondromodulin-1 [61, 62]
Angiopoietin-1 [16]*	IL-1 [42]	Endostatin*	
bFGF*	IL-8 [43]	Hyaluronic acid	
Endoglin*	TGF- $\beta_{1/2/3}$ [44]	(high molecular weight)*	
Hepatocyte growth factor*	TNF- α [45]	Platelet factor-4 [50, 51]	
Epidermal growth factor*	IL-18 [46]	Somatostatin [52, 53]	
IL-1 [17]*	Connective tissue growth	Bactericidal/	
IL-8 [18]*	factor [47, 48]	permeability-increasing	
Angiogenin*		protein [54, 55]	
TGF- β [19]*		IL-4 [35, 36]	
TNF- α [20]*			
Platelet-derived endothelial			
cell growth factor*			
Endothelial cell-stimulating			
angiogenesis factor*			
Hyaluronic acid			
(low molecular weight)*			
IL-18 [21, 22]			
Stem cell-derived factor-1 [23, 24]			
Fractalkine [25, 26]			
Platelet-derived growth factor [27, 28]			
Pleiotrophin [29, 30]			
Soluble E-selectin [31, 32]			
Vascular cell adhesion molecule-1 [31, 33]			
IL-4 [34, 35]			

*Primary references can be found in reference 63.

Tableau 1 : Régulateurs de l'angiogénèse localisés ou exprimés par les tissus de l'articulation arthrosique

La famille du Vascular endothelial growth factor (VEGF) représentée majoritairement par l'isoforme VEGF-A est le médiateur principal de l'angiogénèse. Le VEGF est important pour la régulation de la formation de la plaque de croissance, du cartilage et de l'os. Cependant, dans un cartilage adulte sain, il n'y a pas d'expression de VEGF et le tissu est avasculaire. L'apparition du VEGF au niveau du cartilage articulaire est vue comme une tentative de réparation d'un cartilage endommagé [61]. Ces facteurs (VEGFs) induisent la sécrétion, par les chondrocytes, de métalloprotéinases (MMPs) et de protéines tels les ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs), et empêchent les inhibiteurs des MMPs de se fixer sur leur cible [62]. Un environnement physiologique idéal pour une dégradation du cartilage se crée à cause des facteurs cataboliques qui trouvent une voie d'entrée vers le cartilage articulaire via l'invasion vasculaire, supporté par l'inhibition des enzymes dégradant le cartilage. Le cartilage s'abîme, ses propriétés mécaniques s'altèrent et influent sur l'équilibre du remodelage de l'os sous-chondral impactant sa capacité à répondre aux nouvelles contrainte de charges [63].

III.4.2 Facteurs d'Innervation

Dans l'arthrose comme dans divers pathologie (cancer, métastases osseuses granulome sous cutané), l'angiogenèse est associée à la croissance de nerfs périvasculaires [64, 65]. Dans l'arthrose, les vaisseaux sanguins qui traversent la tidemark et envahissent le cartilage articulaire peuvent être associés à des nerfs sensoriels périvasculaires, tout comme les vaisseaux qui accompagnent le développement des ostéophytes [66]. La douleur qui est le symptôme majeur des patients atteints d'arthrose peut être due à cette innervation périvasculaire, qui tient résidence dans des tissus normalement non innervés et qui sont dans notre cas le cartilage articulaire. La synoviale et l'os sous – chondral sont constamment exposés aux stimuli mécaniques et chimiques et peuvent contribuer aux douleurs de l'arthrose [67].

Des péptides fibres nerveuses sympathiques (Neuropeptide Y-positive, NPY) et sensorielles, (substance P et calcitonin gene-related peptide-I) (SP- et CGRP-positive) ont été localisées dans le cartilage articulaire de plateaux tibiaux humains atteint d'arthrose mais aussi dans la synoviale avec une prépondérance pour les fibres SP-positive [35, 68]. La SP et la CGRP sont capables d'induire l'inflammation et le relargage de facteurs pro-inflammatoires dans le liquide synovial, la SP peut aussi causer la progression de l'arthrose [69, 70]. Les neuropeptides, tels que la CGRP et SP, agissent aussi sur les récepteurs vasculaires spécifiques pour réguler le flux sanguin et la perméabilité, mais aussi pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales, la migration et la formation des tubes vasculaires, ce qui augmente la croissance des vaisseaux sanguins [71]. Les neuropeptides sympathiques, tels que le NPY, sont des vasoconstricteurs aiguës, mais pourraient par la suite augmenter le flux sanguin à travers la promotion de l'angiogenèse.

L'expression de SP et de CGRP peut être augmentée par le Neuronal Growth Factor (NGF) [72]. Le NGF a été décrit comme un facteur de croissance embryonnaire et de différenciation de la crête neuronale et des neurones sympathiques et sensoriels [73]. Chez les adultes, il régule la régénération neuronale contre les blessures et la perception de la douleur [74]. Les nocicepteurs (récepteur périphérique de la douleur) expriment la tyrosine kinase récepteur A (TrkA) qui est le principal ligand pour NGF. Le NGF se lie avec une affinité élevée au TrkA et faiblement au p75. Le premier active la voie MAP kinases, phosphatidylinositol-3 (PI3) -kinase et Ras. La voie de signalisation p75 comprend l'activation de Jun kinase, du facteur nucléaire kappa B (NF-kappa B) entre autres [75]. Puisque TrkA est le principal récepteur de NGF, il peut

être considéré comme l'un des récepteurs pour la modulation de la douleur. L'expression de TrkA est stimulée par le NGF lui-même dans le cerveau antérieur de rat ce qui suggère que la régulation positive du NGF peut conduire à une amplification de la sensation de la douleur (hyperesthésie et allodynie) [76]. Fait intéressant, les neurotransmetteurs proinflammatoires induisent la surexpression du NGF qui peut entraîner un mécanisme auto-entretenu aboutissant à une sensation de douleur chronique [77]. En outre, le NGF peut également induire directement l'inflammation en activant la chimiotaxie des polynucléaires leucocytes et en augmentant la perméabilité vasculaire [78, 79].

Ces neurotransmetteurs montrent donc de multiples mécanismes d'action en agissant comme neurotransmetteurs dans le système nerveux central (SNC), ils peuvent induire ou maintenir l'inflammation et jouer un rôle fondamental dans l'angiogenèse et ainsi moduler la pathogenèse de l'arthrose [80].

III.4.3 Facteurs d'Inflammation

L'inflammation peut aggraver la dégradation du cartilage dans l'arthrose [81]. Les patients souffrant d'arthrose chez lesquels les scores radiologiques progressent rapidement ont tendance à avoir des concentrations sériques plus élevées en protéine C-réactive (CRP) que ceux dont la maladie progresse lentement [82, 83]. Le TNF- α et l'IL-1 β stimulent la sécrétion chondrocytaire de MMPs et de l'activateur du plasminogène, qui dégradent les protéoglycanes et le collagène de la matrice du cartilage articulaire [84, 85]. Les chondrocytes produisent également de l'IL-1 β qui agit de manière autocrine et stimule la production de MMPs et de l'activateur de plasminogène [86]. L'inflammation et l'angiogenèse sont liées, par exemple, une synovite via la stimulation de l'angiogenèse peut contribuer à l'atteinte articulaire progressive dans l'arthrose [81].

L'immunité innée peut être activée lors de l'arthrose [87]. *Kim et al* ont montré que les niveaux de TLRs sont plus importants dans le cartilage articulaire atteint d'arthrose [88]. De plus, des molécules telles que l'acide hyaluronique à faible poids moléculaire, la fibronectine, la tenascine-C et des alarmines sont des ligands aux TLR-2 et TLR-4 et peuvent être retrouvées dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrose [44, 89]. Ces facteurs peuvent induire des réponses cataboliques des chondrocytes et/ou des réponses inflammatoires dans les synoviocytes. Par exemple, les protéines S100A8 et S100A9 sont impliquées dans l'activation synoviale et la destruction du cartilage, et des niveaux élevés peuvent prédire la destruction du cartilage articulaire lors de l'arthrose [90]. Il a aussi été montré une activation des TLR2 et

TLR-4 des fibroblastes-like synoviocytes au stade précoce de l'arthrose ainsi que des niveaux élevés d'interleukin-15 (IL-15) dans le liquide synovial, suggérant un rôle moteur de l'immunité innée dans le développement du processus arthrosique [87, 91, 92].

Bien que l'arthrose soit une maladie liée à l'âge, les mécanismes spécifiques régissant le processus arthrosique demeurent largement inconnus. Au niveau cellulaire, la sénescence peut être divisée en deux catégories principales : répllicative et sécrétoire. De nombreuses cellules humaines en culture ont une capacité de prolifération limitée. Après une période de prolifération vigoureuse, le taux de division cellulaire décline (sénescence répllicative). Cependant, d'autres types de cellules comme les chondrocytes ont une capacité inférieure à se diviser, ce qui laisse peu de place à la sénescence répllicative. Mais ces cellules ont une grande capacité à synthétiser des médiateurs solubles. Donc, la sénescence sécrétoire devrait être prédominante avec le vieillissement. Cette condition a été appelée senescence-associated secretory phenotype (SASP) qui comprend plusieurs médiateurs inflammatoires et dégénératifs entraînés par le stress oxydatif [93]. Fait intéressant, la SASP est principalement une réponse différée aux dommages (épi) génomiques [93]. En effet, les chondrocytes stimulés par l'IL-1 β produisent plus de MMP-13 avec l'âge, ce qui suggère que les chondrocytes vieillissant acquièrent une SASP [94].

Une autre théorie concernant l'inflammation, le vieillissement et l'arthrose est basée sur la récente découverte des Advanced Glycation Endproducts (AGE), produit par un procédé non enzymatique dans les tissus vieillissant qui affaiblit le cartilage en modifiant ses propriétés mécaniques. Les AGE peuvent déclencher l'activation des chondrocytes en se liant à des récepteurs, appelés récepteurs RAGE, spécifiques présents à la surface de ces derniers. Ce processus peut conduire à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires et MMPs [95, 96]

La littérature est riche en données suggérant que les médiateurs inflammatoires jouent un rôle central dans l'initiation et le maintien du processus arthrosique. La source de ces médiateurs serait locale à partir des cellules des différents tissus de l'articulation et systémique à partir d'autres tissus tels que le tissu adipeux et libérée dans la circulation sanguine, pour atteindre l'articulation par l'intermédiaire du système vasculaire de l'os sous-chondral. Ces médiateurs ont alors un effet délétère sur le cartilage, les os et la synoviale. Décrypter ces voies inflammatoires peut être une voie vers la découverte de médicaments guérissant l'arthrose dans le futur[87].

IV. Rôles de l'os sous-chondral dans l'arthrose

La première preuve d'une éventuelle implication de l'os sous chondral dans l'arthrose est venue de l'étude de *Radin et al* réalisée sur des articulations de moutons montrant que l'insertion d'un implant métallique dans l'os sous-chondral (augmentant sa rigidité), induit une contrainte mécanique accrue dans le cartilage, conduisant à une dégradation du cartilage [97]. Dans l'étude de *Radin et al*, l'insertion de l'implant a simulé le remodelage de l'os sous-chondral comme dans l'arthrose, avec l'apparition de sclérose responsable de l'épaississement et de la raideur accrue et aussi une modification de la minéralisation. Plus il y aura la formation de nouvelles structures osseuses dans les marges articulaires (ostéophytes) et de kystes dans l'os sous-chondral et plus la dégradation du cartilage sera favorisée [97]. De plus, le blocage du remodelage osseux par l'alendronate limite la dégradation du cartilage et la progression de l'arthrose dans des modèles expérimentaux [98]. En parallèle, la prévention de la dégradation du cartilage a été également associée à la diminution du remodelage osseux [63].

IV.1 Vascularisation de la plaque sous-chondral

Dans la région sous-chondrale, il existe un nombre élevé de vaisseaux artériels et veineux, ainsi que des fibres nerveuses, on peut y voir des fines branches de ces vaisseaux s'infiltrer dans le cartilage calcifié. La plaque sous-chondrale est envahie par des espaces creux qui fournissent une connexion directe entre le cartilage calcifié et les travées osseuses [14].

La répartition des perforations dans les parties médiale et latérale du plateau tibial est différente, ces canaux sont préférentiellement regroupés dans la partie centrale de la plaque sous-chondrale, c'est-à-dire dans les régions où le stress est le plus grand [99-101].

La concentration de ces perforations dans les zones fortement sollicitées suggère que le cartilage à cet endroit, et certainement l'os adjacent, sont particulièrement bien approvisionnés en sang [100]. Grâce à ces canaux, les vaisseaux sanguins peuvent atteindre directement le cartilage articulaire. *Lane et al* ont montré que la densité des vaisseaux est 15-25% plus grande dans les articulations fortement chargées ou dans les régions fortement stressées de la même articulation [102].

La néoangiogenèse est caractéristique du remodelage de l'os sous-chondral dans l'arthrose. La vascularisation de l'os sous-chondral semble être associée à la sévérité de l'arthrose et à

la dégradation du cartilage[103]. *Lane et al* montrent un nombre plus élevé de vaisseaux sanguins qui pénètrent dans le cartilage articulaire chez les patients atteints d'arthrose par rapport aux patients sains, et ce nombre est positivement corrélé avec le score modifié de Mankin [104]. De plus, ces canaux ne contiennent pas que des vaisseaux sanguins mais aussi des ostéoblastes et ostéoclastes [104]. En outre, cette vascularisation peut être soutenue par l'expression de protéases, la dégradation de la matrice et le dépôt d'os nouvellement formé autour de ces canaux vasculaires [102, 104]. Et comme cité précédemment, des nerfs sensoriels sont également présents dans les canaux vasculaires à la jonction ostéochondrale et à l'intérieur du cartilage articulaire, ce qui suggère une implication de l'os sous-chondral dans la douleur de l'arthrose [35].

Toutes ces données confirment qu'une voie médullaire existe dans les articulations humaines normales et pathologiques [105, 106]. Là où les canaux sous chondraux existent, les nutriments tout comme des facteurs arthrosiques peuvent atteindre les couches profondes du cartilage (en particulier de la zone calcifiée) par ces perforations et les couches superficielles via la diffusion par le liquide synovial [107].

IV.2 Épaississement de la plaque sous-chondrale

L'épaisseur de la plaque sous-chondrale varie à la fois dans et entre les articulations. Le plateau tibial est plus épais au centre, qui est la zone de contact, qu'à la périphérie [99]. *Milz* a été le premier à présenter des cartes schématisant la variation d'épaisseurs de la plaque sous-chondrale [99]. Lorsque l'on mesure l'épaisseur de la plaque sous-chondrale du plateau tibial, on obtient de façon régulière et concentrique la distribution de l'épaisseur régionale, qui est 7 à 12 fois plus élevée en allant de la périphérie du plateau tibial vers le centre.

Une des théories expliquant la pathogenèse de l'arthrose et son lien avec l'épaississement de la plaque sous-chondrale, repose sur le fait que des charges répétitives provoquent une augmentation initiale du remodelage osseux et que le but pourrait être une adaptation de l'os sous-chondral afin de réparer les dommages causés par le chargement [108]. Ce remodelage accru est associé à une invasion vasculaire des couches profondes du cartilage, qui permet l'accès au cartilage des enzymes chondrolytiques non compensés par des inhibiteurs de protéases [109]. Ce processus entraîne plusieurs effets : l'épaississement de la synoviale, avec ou sans inflammation secondaire, la perte de cellules B de la membrane synoviale et une

diminution des enzymes d'inhibitions. Dès que le cartilage perd son intégrité suite à l'appauvrissement de la MEC en aggrecan, l'articulation est surchargée et alimente à son tour le remodelage osseux. Une boucle rétroactive vicieuse est en place, où l'os essaie toujours de s'adapter aux charges. A la fin, cette boucle entraîne la détérioration du cartilage et la progression de l'arthrose [110].

V. Relation cartilage-Os sous-chondral

Le lien physique étroit entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire a conduit au concept de cross-talk biochimique et moléculaire dans cette région au cours de l'arthrose. Comme les chondrocytes articulaires sont physiquement séparés de l'os sous-chondral sous-jacent par le cartilage calcifié [111], la possibilité d'une régulation paracrine restait discutable. De plus, la minéralisation de la matrice de l'os et du cartilage adulte réduit les chances de toute interaction fonctionnelle. Cependant, la présence de vascularisation et le développement de microfissures dans la matrice osseuse, suggèrent fortement que des médiateurs sécrétés par les chondrocytes et les cellules osseuses sous-chondrales peuvent interagir directement à travers ces canaux [111, 112]. Il a été observé que des produits dérivés du cartilage ou de l'os sous-chondral sont sécrétés dans la cavité articulaire, d'où ils peuvent accéder au cartilage ou à l'os à travers le liquide synovial [113]. Des études sur modèles animaux suggèrent que les nutriments de la cavité médullaire dans l'os peuvent nourrir le cartilage via des canaux, ainsi que des vaisseaux sanguins qui relient l'os sous chondral et le cartilage [114, 115]. Une étude sur des cultures d'explants bovins a montré que l'os sous-chondral influence de manière significative la survie des chondrocytes [116]. En outre, dans l'arthrose, les chondrocytes situés au sein du cartilage dégradé sécrètent des facteurs pouvant jouer un rôle dans l'ostéoclastogénèse et contribuer ainsi à la perte osseuse chondrales [117]. L'hypertrophie du cartilage pendant l'ossification endochondrale semble être le résultat de signaux provenant de différentes cellules telles que des ostéoblastes et des cellules hématopoïétique [118, 119]. Au contraire, il a été démontré que les signaux émis par les chondrocytes hypertrophiques du cartilage de poulet stimulent la différenciation des ostéoblastes et le dépôt de matrice osseuse [120].

Pris ensemble, toutes ces preuves indiquent que l'os sous-chondral et le cartilage sont des structures dynamiques, elles sont capables (1) de supporter la charge; (2) d'adapter leur métabolisme; et (3) et de s'adapter à de nouvelles charges en faisant varier leurs caractéristiques biomécaniques.

C'est dans ce contexte riche en questionnement que nous nous sommes engagés afin de suivre l'évolution de l'arthrose. Nous avons voulu suivre l'évolution du cartilage, de l'os sous-chondral et trabéculaire en utilisant les outils disponibles au sein du laboratoire, la microtomographie assistée par ordinateur, l'histologie et la biologie moléculaire. Nous avons collaboré avec le service d'orthopédie de Lille qui nous a fourni les plateaux tibiaux, le service d'anatomopathologie du CHR d'Orléans pour réaliser nos coupes et colorations histologiques et l'INRA de Jouy-en-Josas pour scanner nos lames histologiques.

Nous avons voulu comparer avec ces différents outils les évolutions et/ou les modifications subies par le cartilage et l'os de l'articulation du genou. Nous avons essayé de faire le lien entre ces tissus afin d'améliorer notre compréhension sur l'arthrose.

Jusqu'à présent le débat concernant les éléments déclenchant l'arthrose restent mal connus. On ne sait pas si le cartilage initie la pathologie ou bien l'os sous-chondral.

Matériels et méthodes

I. Population

L'étude et le recueil des pièces opératoires ont été réalisés entre septembre 2014 et avril 2016 au sein de deux structures hospitalières, le GHICL : Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille et le CHRO : Centre Hospitalier Régional d'Orléans. Les patients ont été sélectionnés par le chirurgien investigateur.

Les critères d'inclusion étaient :

- Une gonarthrose avérée nécessitant la pose d'une prothèse de genou
- et
- Le consentement du patient, recueilli par une fiche d'information et de consentement signée (voir annexes).

Les critères d'exclusion étaient :

- Un antécédent infectieux ostéo-articulaire du genou atteint d'arthrose
- et
- Une maladie rhumatismale chronique inflammatoire évolutive.

Un avis favorable a été émis par le Comité de Protection des Personnes le 19 avril 2013 (voir annexes) sous la référence DC 2013 1779 avec autorisation de collection biologique. Une déclaration à la CNIL a été déposée le 24 octobre 2012 sous le numéro 1625344v0. Le protocole d'étude a été examiné le 22 mars 2016 au comité interne d'éthique un avis favorable a été émis.

Les patients ont tous été informés oralement et par écrit et le consentement a toujours été recueilli par écrit après un délai de réflexion (huit jours) laissé au patient.

II. Les tissus articulaires (plateau tibiaux)

Les plateaux tibiaux atteints d'arthrose ont été prélevés suite à une opération de pose de prothèse de genou. 27 patients atteints d'arthrose avancée ont été sélectionnés (âge $72,2 \pm 10,83$ ans : 7 hommes et 20 femmes)

III. Régions d'intérêt et prélèvements osseux

Les régions d'intérêt ont été choisies d'après une première classification basée sur l'échelle d'Outbridge. Cette échelle est composée de cinq grades selon la détérioration du cartilage articulaire :

- Grade 0 : normal, cartilage sain
- Grade I : ramollissement cartilagineux et gonflement
- Grade II : défaut d'épaisseur et fissures chondrales de moins d'1.5 cm de diamètre
- Grade III : fissuration jusqu'au niveau de l'os sous-chondral dans une zone d'un diamètre supérieur à 1,5 cm
- Grade IV : os sous-chondral exposé

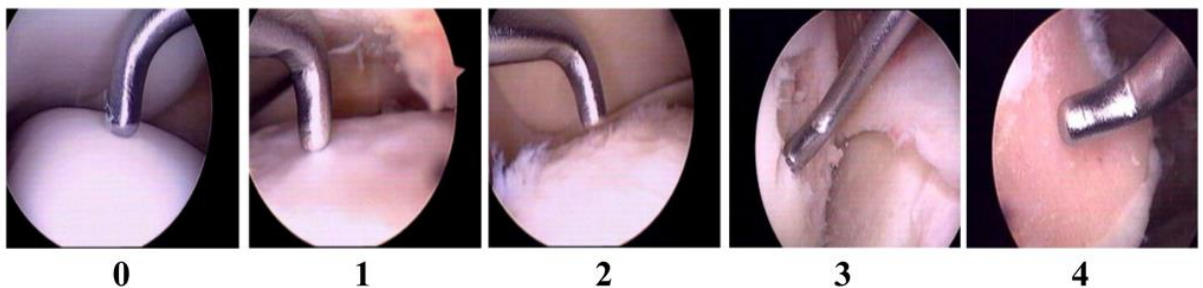


Figure 6: Arthroscopie avec la classification d'Outbridge

Les plateaux tibiaux ont été congelés dans l'azote liquide et 144 carottes cylindriques de 6 mm et 144 de 12 mm de diamètre ont été prélevées à l'aide d'une scie cloche diamantée. Les carottes de 6 mm ont été fixées 24h dans du paraformaldéhyde 4% (PAF), lavées puis stockées dans de l'éthanol 70%. Ces carottes ont servi pour l'étude histologique et microarchitecture osseuse. Les 144 carottes cylindriques de 12 mm de diamètre ont été coupées horizontalement en trois parties afin d'isoler l'os trabéculaire, l'os sous-chondral et le cartilage. Chaque partie a été broyée à l'aide d'un homogénéisateur toujours dans l'azote liquide afin de conserver les ANRs et les protéines, puis stockée à -80° jusqu'au jour de l'extraction.

IV. Histologie

Les carottes de 6 mm ont été décalcifiées pendant 4 semaines dans 14% d'éthylène Diamine Tétra-Acétique pH=7.6 (EDTA) puis incluses dans la paraffine. De chaque carotte six lames ont été colorées à l'hématoxyline éosine safran (HES). Deux lames ont été colorées

toutes les 7 coupes. Les coupes non colorées ont été utilisées pour les besoins de l'immunohistochimie. Chaque lame portait l'identification du plateau, la localisation de la carotte et le numéro de la lame compris entre 1 et 6. Les échantillons ont ensuite été scorés par quatre évaluateurs (MC, AC, MM, RC) selon la version de *Pritzker* de l'échelle Osteoarthritis Research Society International (OARSI) [38]. Le score final de chaque échantillon a été adopté lorsque trois furent d'accord. Les lames colorées ont ensuite été scannées (Pannoramic 150, 3DHISTECH, Budapest, Hungary). Enfin, la surface du cartilage articulaire, de l'os sous-chondral ainsi que son épaisseur ont été manuellement mesurées grâce au logiciel Caseviewer (3DHISTECH, Budapest, Hungary).

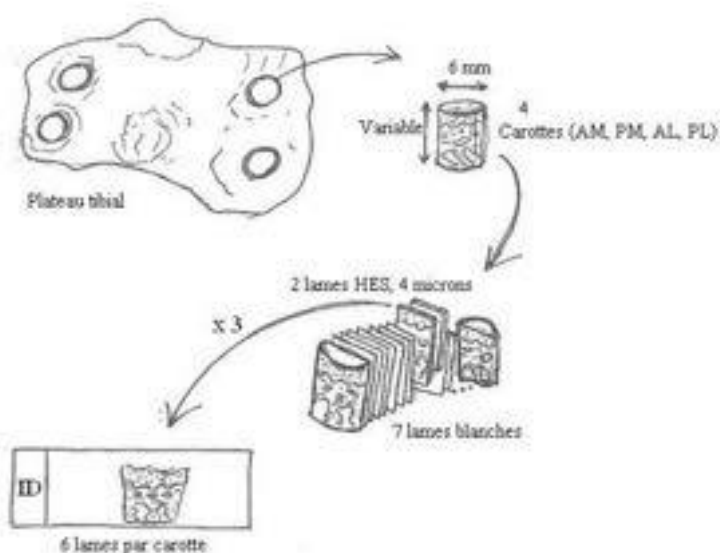


Figure 7 : Procédure histologie. Schéma réalisé par RC

Une segmentation manuelle de l'os sous-chondral, cartilage calcifié et hyalin a été réalisée sur la moitié des lames. Des mesures d'épaisseur et de surface ont été ensuite réalisées suivant deux méthodes :

- Mesures manuelles directement sur la lame en utilisant CaseViewer.
- Mesures *in silico* sur les images segmentées.

Les mesures *in silico* ont été réalisées après extraction des images segmentées via le logiciel PanoramicViewer 150. Les images d'os sous-chondral et cartilage calcifié ont été exportées sous format jpeg. Les images ont ensuite été converties d'images en couleurs en images en niveaux de gris puis traitées sur CtAn afin de les binariser. Les mesures d'épaisseurs et surface ont ensuite été réalisées sur Matlab en appliquant l'algorithme suivant au résultat binaire de la méthode de segmentation :

- Calculer la transformée à distance euclidienne de l'image binaire [121], de sorte que tous les pixels d'arrière-plan soient mis à zéro et les pixels d'avant-plan à la distance de l'arrière-plan.
- Trouver les maxima locaux dans l'image transformée à distance. En supposant qu'il y a des sphères ajustées dans l'image binaire, les points maxima locaux représentent le centre des sphères avec l'axe maximum.
- Calculer la valeur moyenne de ces points, qui représentent l'épaisseur moyenne.

V. Immuno-histo-chimie

Le marquage a été réalisé sur les lames blanches. Les lames ont été déparaffinées et réhydratées grâce à trois bains de xylène de 10 minutes chacun suivis de bains d'éthanol à 96 %, 80 % et 70 % pendant 5 minutes chacun et rincées dans l'eau. Le démasquage de l'antigène a été réalisé dans du tampon citrate à 95°C pendant 25 min. Après refroidissement, les lames sont à nouveau rincées à l'eau et lavées dans du tampon Tris-Hcl 0,05 M (pH 7,6) avec 0,2 % de Tween-20 pendant 5 minutes. L'anticorps primaire est mis à une dilution de 1/100 toute la nuit en chambre humide à 4°C. Le lendemain, les lames sont lavées deux fois 5 min dans le tampon Tris-Hcl 0,05 M (pH 7,6) avec 0,2 % de Tween-20. L'anticorps secondaire fluorescent a ensuite été mis pendant une heure. Enfin, les lames ont été montées pour l'observation sous microscope à fluorescence.

VI. Expression des ARNm par RT q-PCR

VI.1 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du kit « RNeasy minikit » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur avec des modifications « maison » dues à la nature osseuse et cartilagineuse des tissus.

Le jour de l'extraction les échantillons sont sortis du congélateur -80°C, 1 mL de Trizol est ajouté. Une fois à température ambiante, les échantillons sont centrifugés pendant 5min à 12000 g à 4 °C afin de se séparer des impuretés. Le surnageant est transféré dans un autre tube auquel on ajoute 0.3ml de chloroforme. Après 2min d'incubation, on centrifuge à 12000 g pendant 15 min à 4°C. On obtient une phase phénolique inférieure de couleur rouge contenant les protéines, une interphase contenant l'ADN et une phase aqueuse transparente supérieure contenant les ARN. Les ARN sont alors purifiés sur une colonne RNeasy Mini. Le lysat versé dans une colonne est centrifugé 15 sec à 10000 rpm. Le filtrat est éliminé et les ARN restent sur la colonne. Ils sont digérés par la DNase, puis est ajouté 700 µl de tampon RW1 suivi d'une centrifugation de 15 sec à 10000rpm. Le filtrat est éliminé et 500 µl du tampon RPE sont ajoutés pour laver la colonne. Les échantillons sont centrifugés 2 min à 10000 rpm pour laver la colonne. Une deuxième centrifugation est faite pour sécher la membrane de la colonne. Pour l'élution de l'ARN, la colonne est transférée sur un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. 30 µL d'eau ultra pure RNase-Free (Invitrogen) sont déposés sur la membrane pour l'élution et les colonnes centrifugées pour 1 min à 10000 rpm. Les ARN extraits sont conservés à -80 °C.

VI.2 Transcription inverse

La rétro-transcription des ARN totaux permet de synthétiser les ADNc correspondants. Elle est réalisée à l'aide du kit Quantitec de Qiagen selon les recommandations du fournisseur. A partir de 500 ng d'ARN pour chaque échantillon, 2 µl du tampon (gDNA wipeout) et une quantité d'H₂O variable (selon l'échantillon) sont ajoutés à chaque tube pour éliminer l'ADN génomique puis centrifugés brièvement et incubés 2 minutes à 42°C. Après cette courte incubation, le mélange réactionnel constitué de 1 µl de reverse-transcription master mix, 4µl de quantiscript RT buffer et 1 µl du RT primer mix est préparé et ajouté à chaque tube pour avoir à la fin 20 µl dans chacun. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 42°C pour réaliser la transcription inverse (étape d'élongation). La réaction est stoppée par inactivation de l'enzyme 5 min à 95 °C. Cette étape a été réalisée avec un thermocycleur BIORAD.

VI.3 RT-qPCR

Les échantillons d'ADNc sont dilués à une concentration de 1ng/µl. Le mélange réactionnel pour chaque puits de qPCR (volume final 20µl) est constitué de 10 µl de Mix SYBR green, 5µl d'ADNc, d'amorces (quantité variable selon le gène cible) et d'H₂O (quantité variable selon le gène cible). La qPCR en temps réel a été réalisée sur le système Bio-Rad, CFX96TM Real-time et l'analyse des données a été effectuée par le logiciel Bio-Rad CFX manager.

Pour les expériences de qRT-PCR, le GAPDH a été choisi comme un gène de ménage (dont l'expression est en théorie constante).

Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le tableau suivant :

Primers	Forward	Reverse
VEGF	TGTATGTGGGTGGGTGTGTC	CACCATCACCATCGACAGAA
PDGF	CTAGGCTCCAAGGGTCTCCT	GCGGAAGAAGCCAATCTTTA
NGF	CTTCTCACAGCCTTCCTGCT	CCCGAGATGCTGAACAAAGT
PGP9.5	CACAGGAATTCCCAATGGTC	CCCGAGATGCTGAACAAAGT
IL1β	TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA	GGGCCTCAAGGAAAAGAATC
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	TGGGTGGAATCATATTGGAA

Enfin la méthode des delta-delta CT a été utilisée pour quantifier la variation du nombre de copie de l'ARNm d'intérêt entre les conditions comparées.

VII. Expression des protéines

VII.1 Extraction des protéines

Les protéines ont été extraites suivant un protocole maison. Les broyats ont subi deux extractions successives. Une première extraction dans 5 molaires d'acide chlorhydrique pendant 24 heures à 4°C, suivie d'une deuxième extraction dans 6 molaires de Guanidine-HCL dans 50 mM de Tris-HCl contenant 1 mM d'inhibiteur de protéases (phenylmethylsulfonylfluoride, PMSF). Une dialyse a ensuite été réalisée pendant 24 heures dans de l'eau. Enfin, les protéines ont été concentrées à l'aide d'un lyophilisateur.). La concentration des protéines a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique BCA (BiCinchoninic acid Assay).

VII.2 Dot-blot

Le dot-blot a été réalisé sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) préalablement activée dans 100% de méthanol et lavée 5 min dans de l'eau distillée. Une étape de blocage des sites non-spécifiques a aussi été réalisée avec un tampon 3% BSA, 0.1% Tween 20 pendant une heure suivie d'un court lavage dans du PBS-Tween. 5 µg de protéines sont déposés sur la membrane. L'anticorps primaire, dilué à 1/200 dans du tampon de blocage, est ensuite incubé toute la nuit à 4°C. Suivent deux lavages au PBS-Tween pendant 10 min et l'incubation de l'anticorps secondaire HRP pendant une heure. L'acquisition du signal s'effectue après l'ajout de substrat ECL.

Les anticorps utilisés sont indiqués dans le tableau suivant :

VEGF	VEGF (A-20)	Santa Cruz	sc-152
PDGF	PDGF-B (F-3)	Santa Cruz	sc-365805
NGF	Anti-NGF antibody	Abcam	6199
PGP9.5	Anti-PGP9.5 antibody [13C4 / I3C4]	Abcam	8189
IL1 β	IL1- β (H-153)	Santa Cruz	sc-7884
SP	Anti-Substance P antibody	Abcam	133240

VIII. Microarchitecture osseuse

Les carottes osseuses ont été scannées à l'aide d'un Skyscan 1072 (Bruker microCT, Belgique). La résolution d'acquisition était de 10.41 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. La tension du tube à rayons X était de 60.5 kV et l'ampérage à 100 μA avec un filtre en aluminium de 1 mm d'épaisseur. Le temps d'exposition était de 5712 ms, 0.7° de pas et un angle de scan de 180°.

Les images ont été reconstruites et analysées avec la suite logicielle du fabricant, NRecon pour la reconstruction et CTan pour l'analyse de la microarchitecture.

Les os sous-chondral et trabéculaire ont été manuellement segmentés et analysés séparément.

IX. Statistiques

Les données histologiques et de microarchitecture ont été comparées à l'aide du test de Kruskal-Wallis. Nous avons choisi de calculer les corrélations entre nos différents résultats en appliquant le facteur de corrélation de Spearman car la majorité de nos séries de données ne suivaient pas la loi normale.

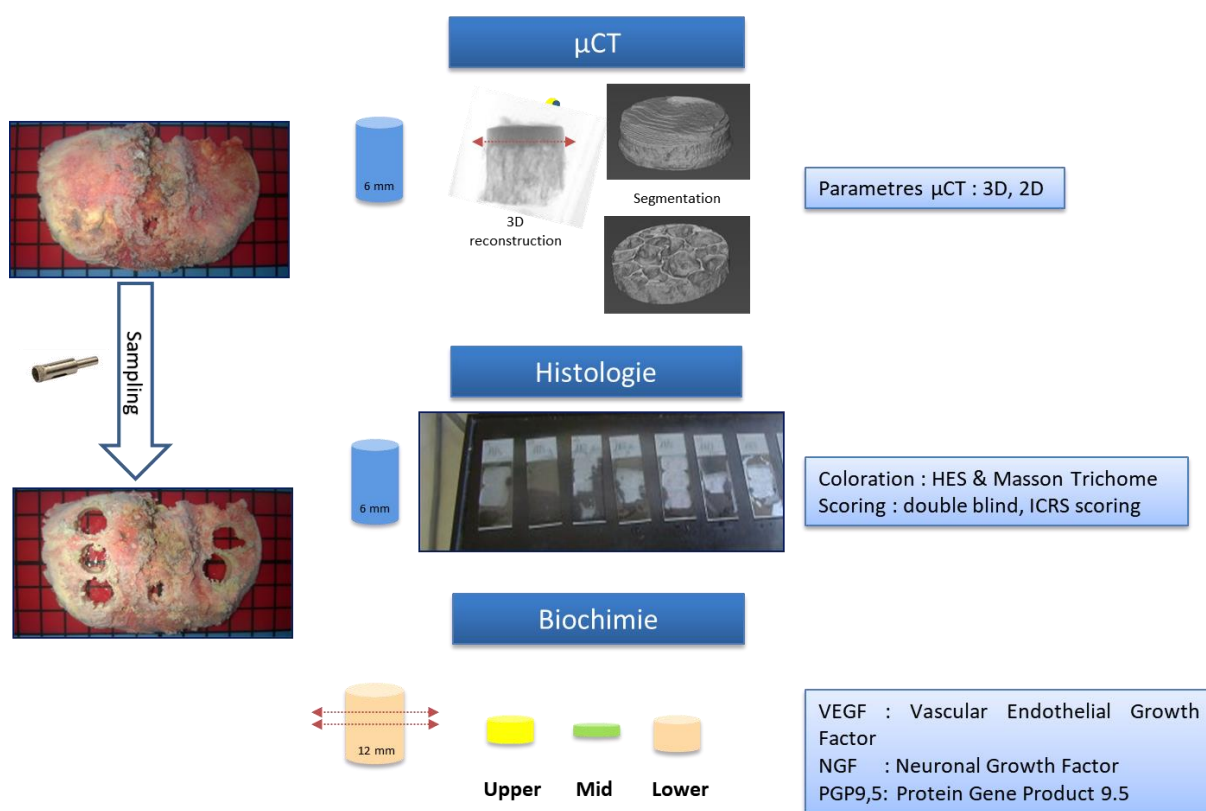


Figure 8: Schéma récapitulatif du protocole expérimental

Résultats

I. La population

27 patients ont été intégrés dans notre étude, 7 hommes et 20 femmes. Leur âge moyen était de $72,2 \pm 10,83$ ans. Les $\frac{3}{4}$ de la population étaient des femmes, l'indice de masse corporelle moyen était de 27.1 ± 7.3 correspondant à une population en surpoids voire obèse.

II. Histologie

Afin de pouvoir observer les modifications histologiques du tissu ostéo-articulaire, la première étape était d'établir les grades OARSI de chaque échantillon. Nous nous sommes basés sur la version de *Pritzker* de l'échelle OARSI [41]. Les échantillons ont été répartis en 6 groupes selon leur grade d'arthrose (Figure 1).

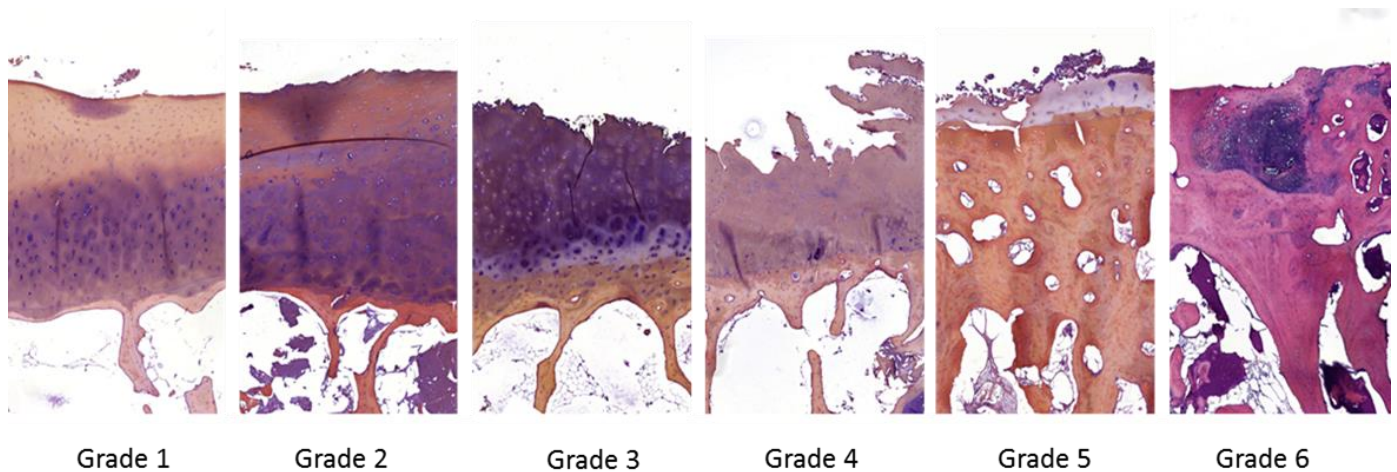


Figure 9: Scoring OARSI réalisé par l'équipe

Nous avons ensuite mesuré manuellement les paramètres histologiques suivant :

- L'épaisseur (Eos) et la surface de l'os sous-chondral (Sos)
- L'épaisseur (Ec) et la surface du cartilage hyalin (Sch)
- L'épaisseur (Ecc) et la surface du cartilage calcifié (Scc)
- Le nombre de canaux sanguins (CS)

Figure 10: Maintien de l'épaisseur ostéo-chondral sur les différents grades d'arthrose.

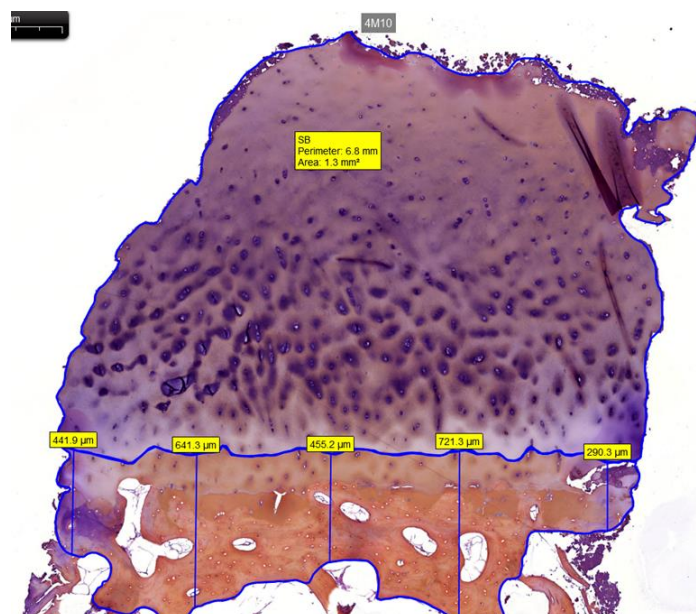
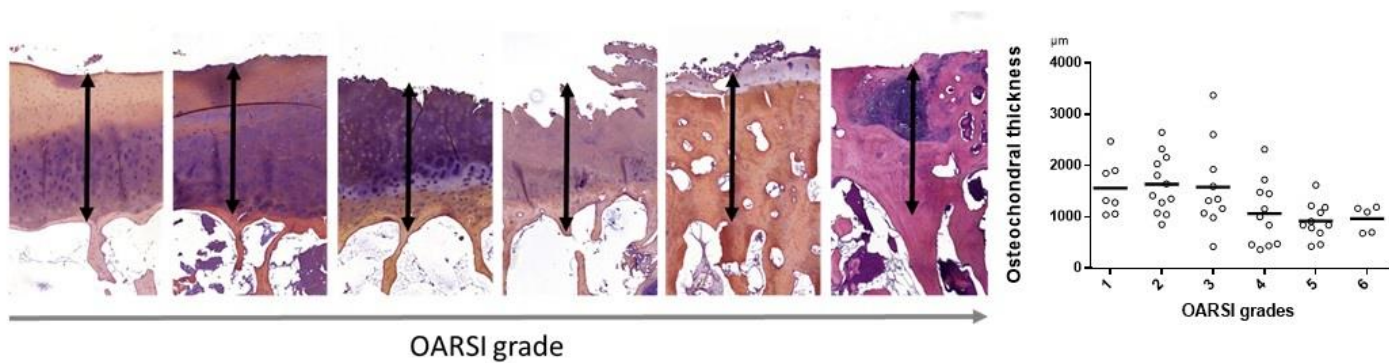


Figure 11: Mesures histologiques effectuées sur une coupe d'une carotte osseuse colorée en HES. Les mesures sur la surface du cartilage articulaire, surface de l'os sous-chondral et épaisseur de l'os sous-chondral y sont représentées.

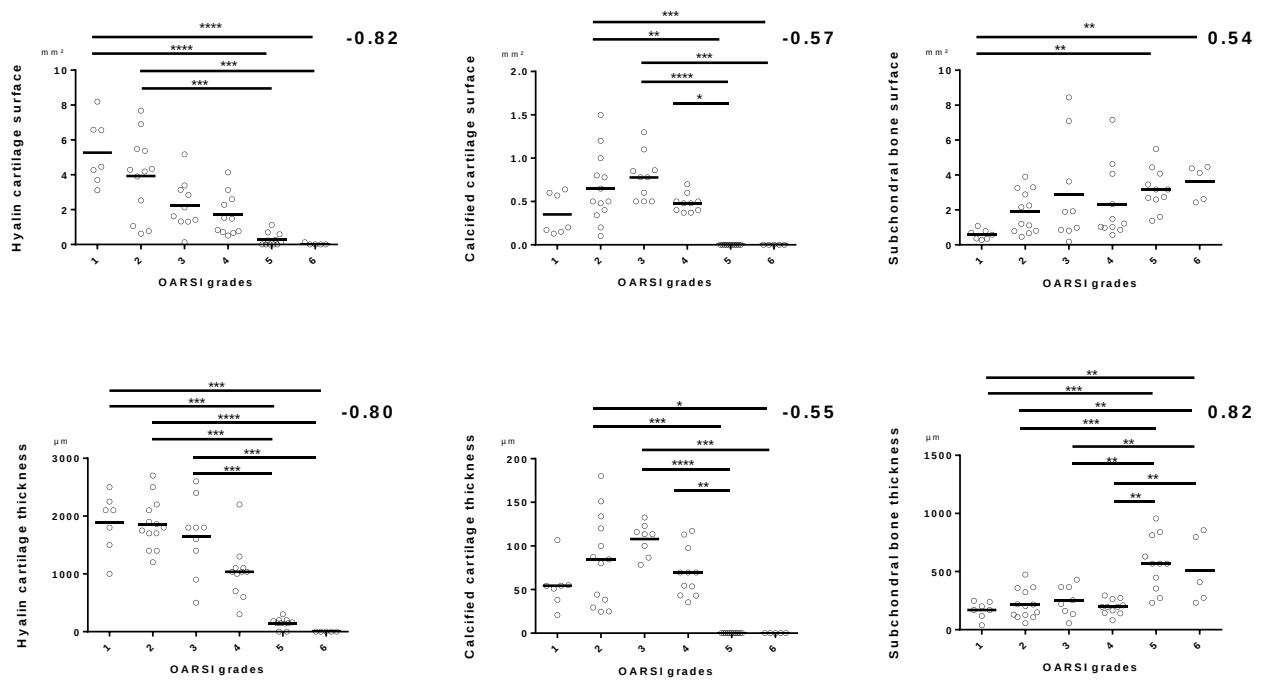


Figure 12: Résultats des mesures histologiques. Les épaisseurs et surface de sous-chondral, du cartilage calcifié et hyalin sont représentées en fonction du grade OARSI. Dans le coin haut à droite de chaque graphique est affiché le coefficient de corrélation entre le paramètre mesuré et l'échelle OARS

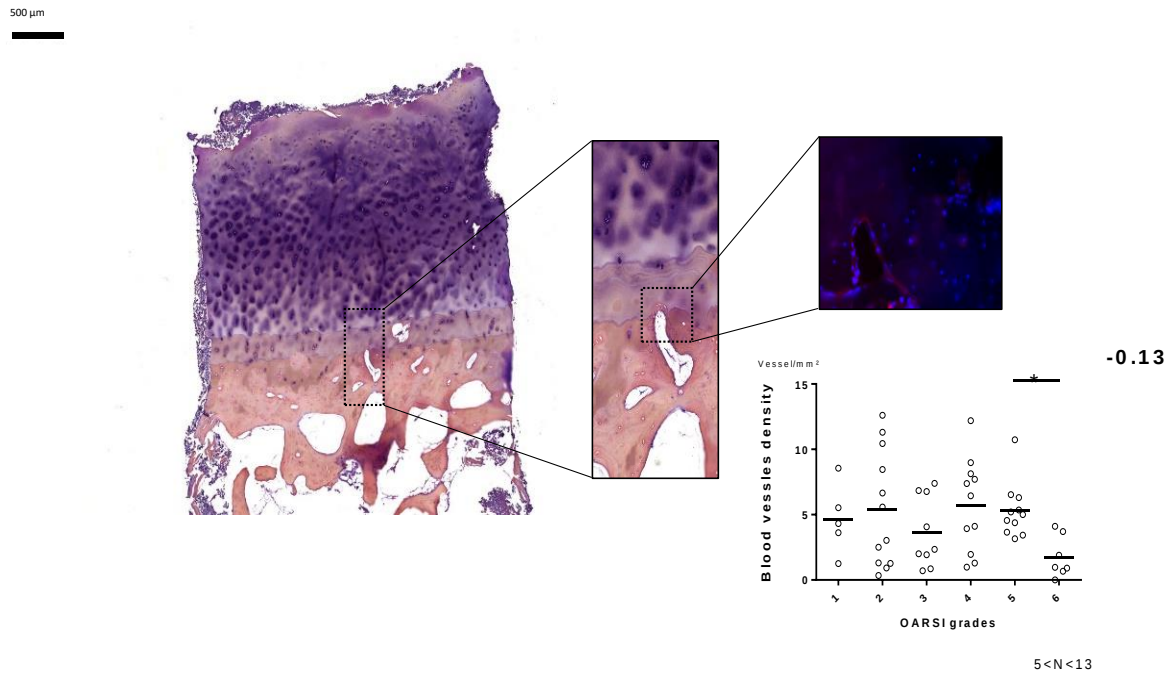


Figure 13: Coupe histologique d'une carotte osseuse avec un zoom sur un cône sanguin immunomarké au VEGF. Le graphique représente le nombre de cônes par surface en fonction du grade OARSI.

II.1 Epaisseur ostéo-articulaire

L'épaisseur ostéo-articulaire est la somme de l'épaisseur du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral. La Figure 10 représente l'épaisseur ostéo-articulaire en fonction du grade OARSI, curieusement cette épaisseur qui sépare la capsule articulaire de la moelle osseuse n'évolue pas, l'os remplace l'espace laissé par la dégradation du cartilage au fur et à mesure de son érosion. Aucune différence significative n'a été trouvée avec l'aggravation du grade OARSI.

II.2 Epaisseur et surface du cartilage hyalin

Sur la Figure 12 on retrouve la surface du cartilage articulaire hyalin en fonction du grade OARSI. On note une diminution classique de cette surface avec amincissement jusqu'à disparition totale du cartilage avec l'aggravation du grade OARSI. Des différences significatives ont été trouvées entre les deux premiers groupes (les moins endommagés) et les deux derniers groupes (les plus endommagés) 1 vs 5 ($p < 0.0001$), 1 vs 6 ($p < 0.0001$), 2 vs 5 ($p < 0.001$), 2 vs 6 ($p < 0.001$). Il existe une forte corrélation négative entre la surface du cartilage et le grade OARSI $r = -0,82$.

L'épaisseur du cartilage hyalin était inchangée sur les deux premiers grades, l'épaisseur moyenne au grade trois est similaire aux deux premiers mais elle diffère en raison de son hétérogénéité.

II.3 Epaisseur et surface du cartilage calcifié

L'épaisseur du cartilage calcifié évolue différemment par rapport au cartilage hyalin. Quand ce dernier tend à se dégrader continuellement, le cartilage calcifié s'épaissit sur une première phase incluant les trois premiers grades puis, à partir du grade quatre une deuxième phase caractérisée par amincissement dramatique s'opère jusqu'à la disparition totale du cartilage calcifié. Même constat pour la surface, l'évolution du cartilage calcifié forme une gaussienne. Les différences significatives sont présentes entre les grades intermédiaires et avancés ; 2 vs 5 ($p < 0.001$), 2 vs 6 ($p < 0.01$), 3 vs 5 ($p < 0.001$), 3 vs 6 ($p < 0.0001$) et 4 vs 5 ($p < 0.01$) respectivement.

II.4 Epaisseur et surface de l'os sous-chondral

La Figure 12 présente aussi l'épaisseur de l'os sous-chondral en fonction du grade OARSI. L'os sous-chondral s'épaissit jusqu'à former une plaque au grade le plus avancé de la pathologie. L'épaississement de la plaque sous-chondrale suit un schéma linéaire qui évolue en fonction du score OARSI ($r = 0,82$). Il existe des différences significatives entre les groupes,

1 vs. 5 ($p<0.001$), 1 vs. 6 ($p<0.01$), 2 vs. 5 ($p<0.001$), 2 vs. 6 ($p<0.01$), 3 vs. 5 ($p<0.0001$), 3 vs. 6 ($p<0.01$), 4 vs. 5 ($p<0.01$), 4 vs. 6 ($p<0.01$). L'épaississement de l'os sous-chondral est aussi fortement corrélé au grade OARSI $r=0,82$. La surface de l'os sous-chondral augmente aussi mais contrairement à l'épaisseur, les mesures sont beaucoup dispersées.

II.5 Vascularisation

Nous avons compté le nombre de cônes vasculaires (Figure 5). La distribution de la vascularisation était très aléatoire. Elle est présente à tous les grades d'arthrose, néanmoins une diminution significative a été observée sur le dernier grade d'arthrose 5 vs. 6 ($p<0.05$).

III. Microarchitecture osseuse

Les propriétés de l'os sous-chondral influencent l'intégrité du cartilage articulaire dans la pathogenèse de l'arthrose. Pour cela, nous avons étudié les caractéristiques et les altérations osseuses sous-chondrales. La partie osseuse de nos échantillons, est composée de deux structures osseuses ; l'os sous-chondral adjacent au cartilage articulaire, et en dessous de celui-ci, l'os trabéculaire. Comme ces deux tissus ont une structure et un rôle propre à chacun nous les avons segmentés manuellement afin de les étudier séparément afin d'avoir une vision précise des altérations et une meilleure compréhension de l'adaptation de chacun à la pathologie.

Lors de ce travail, nous avons retenu cinq paramètres de microarchitecture pour l'os sous-chondral ; le nombre et le volume des pores (P.N et P.Vtot), la surface spécifique osseuse (sBS/BV), l'épaisseur de l'os sous-chondral mesurée sur les images μ CT (μ Ep) et la dimension fractal (FD). Pour l'os trabéculaire nous avons retenu sept paramètres ; le volume de la fraction osseuse (BV/TV), la surface spécifique osseuse (tBV/BV), l'index du modèle de structure (SMI), l'épaisseur des travées (Tb.Th), le nombre de travées (Tb.N), la séparation des travées (Tb.S) et le facteur de modèle trabéculaire (Tb.Pf). Les échantillons ont été classés selon leur grade. Pour rappel, ce sont ces mêmes carottes osseuses qui ont été utilisées pour l'histologie.

III.1 Microarchitecture de l'os sous-chondral

La BS/BV baisse progressivement en fonction du grade OARSI, les diminutions les plus significatives ont été observées entre les groupes 1 vs 4 ($p<0.01$), 4 vs 5 ($p<0.05$) and 5 vs 6 ($p<0.01$). Ce paramètre était faiblement corrélé au grade OARSI $r=-0.43$. La FD a progressivement augmenté, la différence la plus marquée était entre le groupe 1 vs 6 ($p<0.01$) avec un facteur de corrélation de $r=0.53$.

Le nombre ainsi que le volume de pores dans l'os sous-chondral augmentent significativement. Il existe une différence significative du nombre de pores entre les groupes 1 vs 6 ($p<0.05$), 1 vs 5 ($p<0.01$) et 3 vs 5 ($p<0.05$) en fonction du grade OARSI. Concernant le volume, des différences significatives ont été observées entre les groupes 1 vs 6 ($p<0.05$), 1 vs 5 ($p<0.01$) and 2 vs 6 ($p<0.01$). Ces deux paramètres étaient corrélés au grade OARSI avec $r=0.66$ et 0.64 , respectivement. Figure 14

La mesure de l'épaisseur de l'os sous-chondral par μ CT montre une augmentation significative entre les groupes 1 vs 6 ($p<0.001$), 1 vs 5 ($p<0.001$), 2 vs 6 ($p<0.01$), 2 vs 5 ($p<0.01$), 3 vs 6 ($p<0.01$), 3 vs 5 ($p<0.01$), 4 vs 6 ($p<0.01$), et 4 vs 6 ($p<0.01$). L'épaississement de l'os sous-chondral est corrélé fortement avec le grade OARIS $r=0.69$. Figure 6

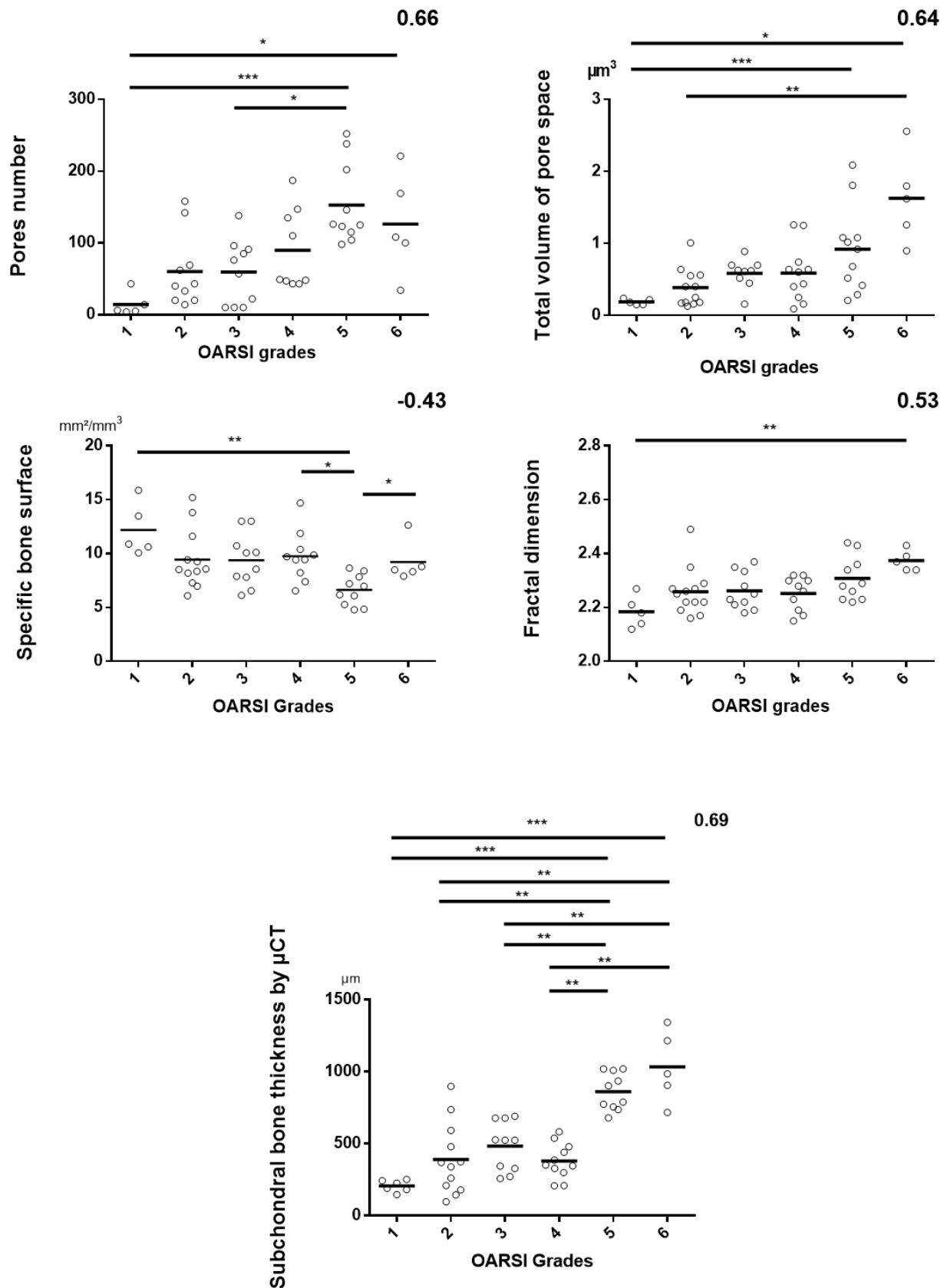


Figure 14: Microarchitecture de l'os sous-chondral. Les graphiques représentent le P.N, P..Vtot, tBS/BV, FD et μEP en fonction du grade OARSI. Dans le coin haut à droite de chaque graphique est affiché le coefficient de corrélation entre le paramètre mesuré et l'échelle OARSI.

III.2 Microarchitecture de l'os trabéculaire

L'augmentation du BV/TV a été observée à partir du grade 4, puis a doublé au grade 6 (63 ± 5.0) par rapport au grade 1 (27 ± 8.3). Les augmentations les plus significatives ont été observées entre les groupes 1 vs 6 ($p < 0.05$), 2 vs 6 ($p < 0.01$) and 3 vs 6 ($p < 0.01$). L'évolution du BV/TV était corrélée au grade OARSI $r = 0.61$. La surface spécifique de l'os trabéculaire (tBS/BV) a diminué significativement entre les groupes 1 vs 6 ($p < 0.05$), 2 vs 6 ($p < 0.05$) and 3 vs 6 ($p < 0.05$). Cette diminution était inversement corrélée au grade OARSI avec $r = -0.55$. La SMI a aussi diminuée avec l'aggravation du grade OARSI, les diminutions les plus significatives ont été observées entre les groupes 1 vs 6 ($p < 0.05$), 2 vs 6 ($p < 0.01$) et 3 vs 6 ($p < 0.05$). La SMI était inversement corrélée au grade OARSI avec $r = -0.52$. Figure 7

Tb.Th et Tb.N ont tous les deux augmenté avec le grade OARSI, Tb.S et Tb.Pf ont quant à eux significativement diminués.

Tb.Th a significativement augmenté entre les groupes 2 vs 6 ($p < 0.01$) et 3 vs 6 ($p < 0.01$), et était faiblement corrélé au grade OARIS avec $r = 0.48$.

Tb.N a aussi subi une augmentation avec des différences significatives entre les groupes 1, 2, 3 and 4 vs 6 ($p < 0.05$) et était faiblement corrélé au grade OARIS avec $r = 0.4$.

Tb.S et Tb.Pf ont significativement diminué entre les groupes 1, 2 et 3 vs 6 avec $p < 0.05$ et 0.01, respectivement, en fonction du grade OARSI. Tb.S et Tb.Pf étaient inversement corrélés au grade OARSI avec $r = -0.38$ et -0.55 , respectivement. Figure 7

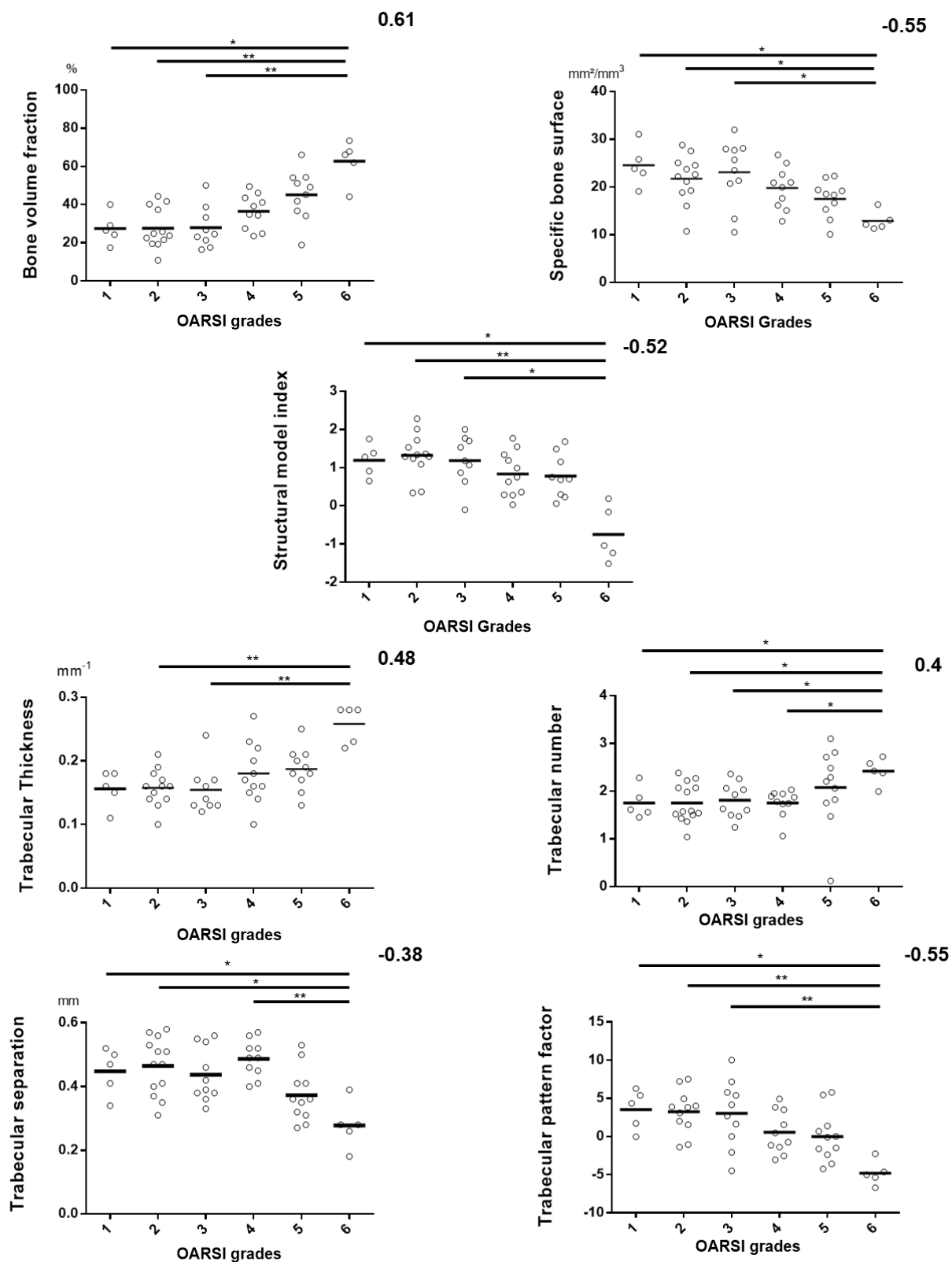


Figure 7: Microarchitecture de l'os trabéculaire. Les graphiques représentent BV/TV, tBS/BV, SMI, Tb.Th, Tb.N, Tb.S et Tb.Pf en fonction du grade OARSI. Dans le coin haut à droite de chaque graphique est affiché le coefficient de corrélation entre le paramètre mesuré et l'échelle OARSI.

IV. Corrélations

Nous avons voulu savoir corrélérer les modifications osseuses et cartilagineuses observées grâce à nos deux modalités d'analyses, l'histologie et la micro-tomographie. Les paramètres de microarchitectures testés étaient le nombre et le volume des pores (P.N et P.Vtot), la surface spécifique osseuse (BS/BV), l'épaisseur de l'os sous-chondral mesurée sur les images μ CT (μ Ep) et la dimension fractale (FD). Pour l'os trabéculaire nous avons retenu sept paramètres : le volume de la fraction osseuse (BV/TV), la surface spécifique osseuse (tBV/BV), l'index du modèle de structure (SMI), l'épaisseur des travées (Tb.Th), le nombre de travées (Tb.N), la séparation des travées (Tb.S) et le facteur de modèle trabéculaire (Tb.Pf). Pour les paramètres histologiques nous avons retenu l'épaisseur de l'os sous-chondral (Eos), l'épaisseur de cartilage hyalin et calcifié, le nombre de canaux sanguins (CS).

Nous avons croisé tous les paramètres entre eux dans une analyse de corrélation linéaire. Les résultats sont présentés ci-dessous.

IV.1 Correlation entre les paramètres histologiques

Tableau 2 présente les coefficients de corrélations de Spearman pour les paramètres histologiques.

Des corrélations fortes et statistiquement significatives ont été trouvées entre le grade OARSI et la Ech et Eos (-0.81 et -0.82 respectivement). Le cartilage disparaît de façon linéaire au fur et à mesure que la pathologie s'aggrave. En parallèle, l'os sous-chondral s'épaissit.

L'Ecc était inversement corrélée au score OARSI ($r=-0.58$).

L'évolution de l'épaisseur du cartilage calcifié est liée à celle du cartilage hyalin (0.71) mais pas à l'épaisseur de l'os sous-chondral (-0.44).

	OARSI grades	Ech	Ecc
Ech	-0,81**** -0,88 to -0,69		
Ecc	-0,58**** -0,73 to -0,37	0,71**** 0,55 to 0,82	
Eos	0,82**** 0,57 to 0,84	-0,55**** -0,72 to -0,32	-0,44*** -0,64 to -0,18

Tableau 2: Coefficients de corrélation de Spearman (intervalle de confiance à 95%) entre les paramètres histologiques.

IV.2 Corrélations entre les paramètres histologiques et μ CT

La méthode classique et directe pour examiner les altérations de l'os et du cartilage est l'étude de coupes histologiques. Le μ CT apporte une vision plus résolutive et en 3D des altérations de la microarchitecture de l'os. Comme les deux méthodes possèdent des avantages et inconvénients, nous avons voulu croiser ces deux méthodes afin que l'une palie aux limites de l'autre, dans le but de mieux comprendre l'évolution de l'arthrose.

IV.3 Corrélations entre l'histologie et la microarchitecture de l'os sous-chondral

Tableau 3 présente les coefficients de corrélation entre les paramètres histologiques et de microarchitecture de l'os sous-chondral.

La plupart des paramètres (FD, P.N, P.Vtot et μ Eos) étaient positivement et fortement corrélés au grade OARSI. La corrélation entre grade OARSI et le BS/BV était négative et faible. Il existe une corrélation négative entre l'Ech et P.Vtot et entre l'Ech et μ Eos, la perte du cartilage hyalin est accompagnée par une augmentation du nombre et du volume des pores dans l'os sous-chondral.

L'autre paramètre histologique qui corrèle fortement avec les paramètres de microarchitecture (BS/BV, P.N, P.Vtot et μ Eos) est l'Eos (-0.68, 0.62, 0.67 et 0.92, respectivement).

De plus, la forte corrélation entre l'Eos et la μ Eos (0.92) montre que la mesure de l'épaisseur de l'os sous-chondral, est indépendante de la modalité de mesure utilisée, qu'elle soit calculée sur les coupes histologiques ou par μ CT.

Dans ce modèle d'étude nous n'avons pas trouvé de lien entre l'Ecc et les paramètres de microarchitecture de l'os sous chondral

	OARSI grades	Ech	Ecc	Eos
BS/BV	-0,43*** (-0,63 to -0,19)	0,32* (0,05 to 0,54)	0,27* (-0,001 to 0,50)	-0,68**** (-0,80 to -0,50)
FD	0,53**** (0,31 to 0,70)	-0,39** (-0,60 to -0,14)	-0,34** (-0,56 to -0,085)	0,48*** (0,23 to 0,67)
P.Vtot	0,65**** (0,48 to 0,79)	-0,52**** (-0,69 to -0,30)	-0,37** (-0,58 to -0,11)	0,62**** (0,49 to 0,80)
P.N	0,66**** (0,48 to 0,79)	-0,53**** (-0,70 to -0,31)	-0,40** (-0,61 to -0,16)	0,67**** (0,49 to 0,80)
μ Eos	0,74**** (0,58 to 0,84)	-0,56**** (-0,72 to -0,34)	-0,46*** (-0,65 to -0,21)	0,92**** (0,86 to 0,95)

Tableau 3: Coefficients de corrélation de Spearman (intervalle de confiance à 95%) entre les paramètres histologiques et microarchitecture de l'os sous-chondral.

IV.4 Corrélations entre l'histologie et la microarchitecture de l'os trabéculaire

Le Tableau 4 présente les coefficients de corrélation entre les paramètres histologiques et de microarchitecture de l'os trabéculaire.

Le grade OARSI était fortement corrélé avec le BV/TV (0.61) et inversement corrélé à la SMI et au Tb.Pf. Des corrélations faibles lient le grade OARSI aux Tb.Th, Tb.N et Tb.S (0.49, 0.40 et -0.39, respectivement). Comme pour l'os sous-chondral, l'Eos corrèle fortement avec la majorité des paramètres de microarchitecture de l'os trabéculaire.

L'Eos était positivement et fortement corrélée avec le BV/TV et Tb.Th (0.74 et 0.67, respectivement). L'Eos était négativement et fortement corrélée avec SMI, Tb.Th et Tb.Pf (-0.61, -0.67 et -0.59, respectivement). L'Eos était faiblement corrélée au Tb.N (0.49).

L'Ech était corrélée aux SMI et Tb.Pf (0.53 et 0.55, respectivement) et inversement corrélée au BV/TV (-0.58) indiquant un lien entre la dégradation du cartilage et les adaptations de l'os trabéculaire.

Nous n'avons pas trouvé de lien entre l'Ecc et les paramètres de microarchitecture de l'os trabéculaire.

	OARSI grades	Ech	Ecc	Eos
BV/TV	0,61**** (0,41 to 0,76)	-0,58**** (-0,74 to -0,37)	-0,42** (-0,62 to -0,17)	0,74**** (0,60 to 0,84)
SMI	-0,52**** (-0,69 to -0,30)	0,53**** (0,30 to 0,70)	0,42** (0,17 to 0,62)	-0,61**** (-0,75 to -0,42)
Tb.Th	0,49*** (0,25 to 0,67)	-0,47*** (-0,66 to -0,23)	-0,36** (-0,57 to -0,09)	-0,67**** (-0,79 to -0,50)
Tb.N	0,40** (0,15 to 0,60)	-0,40** (-0,60 to -0,14)	-0,32* (-0,54 to -0,05)	0,65**** (0,47 to 0,78)
Tb.Sp	-0,39** (-0,59 to -0,13)	0,33* (0,07 to 0,55)	0,25 (-0,01 to 0,49)	0,49*** (0,26 to 0,67)
Tb.Pf	-0,56**** (-0,72 to -0,34)	0,55**** (0,33 to 0,71)	0,33* (0,07 to 0,55)	-0,59**** (-0,74 to -0,39)

Tableau 4: Coefficients de corrélation de Spearman (intervalle de confiance à 95%) entre les paramètres histologiques et microarchitecture de l'os trabéculaire.

IV.5 Corrélations entre les paramètres μ CT

1.1.1 Microarchitecture de l'os sous-chondral

Le coin haut gauche de la Eos et FD, P.N et P.Vtot (0.56, 0.70 et 0.67, respectivement). Eos était inversement corrélée à BS/TV (-0.71). BS/TV était aussi inversement corrélé au P.N (-0.62). La FD était corrélée aux P.N et P.Vtot (0.51 et 0.64, respectivement). Enfin le P.N corrélait avec le P.Vtot.

IV.5.1 Microarchitecture de l'os trabéculaire

Le coin bas droit du Tableau 4 présente les coefficients de corrélation entre les paramètres de microarchitecture de l'os trabéculaire. Ces derniers étaient tous fortement corrélés entre eux. La tFD était le paramètre le moins lié aux autres, elle ne corrélait qu'avec tBS/BV, Tb.Th, Tb.N et Tb.Pf (-0.52, 0.57, 0.53 et -0.53, respectivement)

IV.5.2 Microarchitecture de l'os trabéculaire Vs l'os sous-chondral

La partie encadrée du tableau 4 présente les coefficients de corrélation entre les paramètres microarchitecture de l'os trabéculaire et de l'os sous-chondral. μ Esc corrélait avec tous les autres, sauf le tFD. μ Esc corrélait positivement avec BV/TV, Tb.Th et Tb.N. (0.66, 0.60 et 0.59, respectivement). μ Esc était inversement corrélé avec tBS/BV, SMI, Tb.S et Tb.Pf (-0.60, -0.51, -0.57 et -0.64, respectivement). P.N était aussi corrélé au BV/TV et inversement corrélé au tBS/TV (0.58 et -0.55, respectivement)

Tableau 4 présente les coefficients de corrélation entre les paramètres de microarchitecture de l'os sous-chondral. De fortes et positives corrélations ont été trouvées entre la μEsc et FD, P.N et P.Vtot (0.56, 0.70 et 0.67, respectivement). μEsc était inversement corrélée à BS/TV (-0.71). BS/TV était aussi inversement corrélé au P.N (-0.62). La FD était corrélée aux P.N et P.Vtot (0.51 et 0.64, respectivement). Enfin le P.N corrélait avec le P.Vtot.

IV.5.3 Microarchitecture de l'os trabéculaire

Le coin bas droit du tableau 4 présente les coefficients de corrélation entre les paramètres microarchitecture de l'os trabéculaire. Ces derniers étaient tous fortement corrélés entre eux. La tFD était le paramètre le moins lié aux autres, elle ne corrélait qu'avec tBS/BV, Tb.Th, Tb.N et Tb.Pf (-0.52, 0.57, 0.53 et -0.53, respectivement)

IV.5.4 Microarchitecture de l'os trabéculaire Vs l'os sous-chondral

La partie encadrée du Tableau 4 présente les coefficients de corrélation entre les paramètres microarchitecture de l'os trabéculaire et de l'os sous-chondral. μEsc corrélait avec tous les autres, sauf le tFD. μEsc corrélait positivement avec BV/TV, Tb.Th et Tb.N. (0.66, 0.60 et 0.59, respectivement). μEsc était inversement corrélé avec tBS/BV, SMI, Tb.S et Tb.Pf (-0.60, -0.51, -0.57 et -0.64, respectivement). P.N était aussi corrélé au BV/TV et inversement corrélé au tBS/TV (0.58 et -0.55, respectivement)

Subchondral bone parameters						Trabecular bone parameters							
	μEos	BS/TV	FD	P.N	PVtot		BV/TV	tBS/TV	SMI	Tb.Th	Tb.N	Tp.S	Tb.Pf
Subchondral bone parameters	BS/TV	-0,71***** (-0,83 to -0,55)											
	FD	0,56***** (0,34 to 0,72)	-0,21 (-0,46 to 0,058)										
	P.N	0,70***** (0,52 to 0,82)	-0,62***** (-0,76 to -0,43)	0,51***** (0,29 to 0,69)									
	PVtot	0,67***** (0,48 to 0,80)	-0,27* (-0,50 to -0,0067)	0,64***** (0,44 to 0,77)	0,61***** (0,41 to 0,75)								
	BV/TV	0,66***** (0,47 to 0,79)	-0,44*** (-0,63 to -0,19)	0,39** (0,14 to 0,60)	0,58***** (0,41 to 0,75)	0,41** (0,16 to 0,61)							
Trabecular bone parameters	tBS/TV	-0,60***** (-0,75 to -0,39)	0,47*** (0,23 to 0,66)	-0,34* (-0,56 to -0,078)	-0,55***** (-0,71 to -0,33)	-0,41** (-0,61 to -0,16)	-0,78***** (-0,87 to -0,64)						
	SMI	-0,51***** (-0,68 to -0,27)	0,30* (0,039 to 0,53)	-0,42** (-0,62 to -0,17)	-0,42** (-0,62 to -0,17)	-0,36** (-0,57 to -0,098)	-0,69***** (-0,81 to -0,52)	0,62***** (0,43 to 0,76)					
	Tb.Th	0,60***** (0,39 to 0,75)	-0,38** (-0,59 to -0,13)	0,37** (0,11 to 0,58)	0,43*** (0,19 to 0,63)	0,34** (0,081 to 0,56)	0,79***** (0,67 to 0,88)	-0,79***** (-0,87 to -0,66)	-0,62***** (-0,76 to -0,42)				
	Tb.N	0,59***** (0,38 to 0,75)	-0,43*** (-0,63 to -0,19)	0,29* (0,029 to 0,52)	0,40** (0,15 to 0,61)	0,32* (0,059 to 0,54)	0,66***** (0,47 to 0,79)	-0,52***** (-0,69 to -0,29)	-0,56***** (-0,72 to -0,34)	0,55***** (0,33 to 0,71)			
	Tp.S	-0,57***** (-0,73 to -0,35)	0,41** (0,16 to 0,61)	-0,18 (-0,42 to 0,096)	-0,36** (-0,57 to -0,098)	-0,26* (-0,50 to 0,0043)	-0,68***** (-0,80 to -0,50)	0,44*** (0,20 to 0,64)	0,45*** (0,20 to 0,64)	-0,51***** (-0,68 to -0,28)	-0,76***** (-0,30 to 0,70)		
	Tb.Pf	-0,64***** (-0,78 to -0,45)	0,40** (0,14 to 0,60)	-0,41** (-0,61 to -0,16)	-0,53***** (-0,70 to -0,31)	-0,45*** (-0,64 to -0,20)	-0,87***** (-0,93 to -0,79)	0,86***** (0,77 to 0,92)	0,76***** (0,62 to 0,85)	-0,74***** (-0,84 to -0,59)	-0,68***** (-0,80 to -0,50)	0,55***** (0,33 to 0,71)	
	tFD	0,32* (0,042 to 0,55)	-0,24 (-0,48 to 0,033)	0,16 (-0,12 to 0,41)	0,23 (-0,047 to 0,47)	0,06 (-0,22 to 0,33)	0,48*** (0,23 to 0,66)	-0,52***** (-0,69 to -0,29)	-0,32* (-0,54 to -0,050)	0,57***** (0,35 to 0,73)	0,53***** (-0,85 to -0,62)	-0,44*** (-0,63 to -0,19)	-0,52***** (-0,70 to -0,29)

Tableau 4: Coefficients de corrélation de Spearman (intervalle de confiance à 95%) entre les paramètres de microarchitecture de l'os sous-chondral et trabéculaire.

V. qRT-PCR

Lors de ces travaux de thèse nous nous sommes intéressés aux phénomènes de vascularisation et d'innervation liés à l'arthrose. En plus d'avoir compté les cônes sanguins sur les coupes histologiques, nous avons aussi mesuré l'expression de deux marqueurs vasculaires VEGF-A et PDGF. Deux marqueurs liés à l'innervation ont aussi été choisis NGF et PGP9.5.

Le VEGF est connu pour son rôle d'initiation de l'angiogénèse, et son implication dans l'arthrose a déjà été reportée. Le PDGF contribue à l'angiogénèse en stimulant la croissance des vaisseaux déjà existant.

Le NGF joue un rôle critique dans la survie et le maintien des fibres nerveuses sympathiques et des neurones sensoriels. Le PGP9.5 est exprimé par les neurones et les fibres nerveuses.

La Figure 8 présente les expressions relatives des ARNm des marqueurs de vascularisation et d'innervation dans le cartilage, l'os sous-chondral et trabéculaire. Pour rappel, les carottes extraites des plateaux tibiaux ont été coupées en trois afin de séparer le cartilage, l'os sous-chondral et trabéculaire.

V.1 Expression de l'ARN messager VEGF (mVEGF)

On détecte le mVEGF au niveau du cartilage articulaire et son expression est présente à partir du grade deux. Son expression augmente, un pic est détecté au grade 4 puis décroît. Le mVEGF est aussi détecté au niveau de l'os sous-chondral mais cette fois plus tardivement, il est seulement au grade 4. Au niveau de l'os trabéculaire, l'expression du mVEGF est présente à tous les stades avec une tendance à l'augmentation en fonction du développement de la pathologie.

V.2 Expression de l'ARN messager PDGF (mPDGF)

L'expression du mPDGF est détectée dans le cartilage articulaire et comme pour le mVEGF son expression augmente jusqu'au grade 4 puis disparaît. Au niveau de l'os trabéculaire, l'expression du mPDGF est présente à tous les stades avec une tendance à l'augmentation en fonction du développement de la pathologie. Nous n'avons pas détecté de mPDGF dans l'os sous-chondral.

V.3 Expression de l'ARN messager NGF (mNGF)

Le mNGF est aussi présent dans le cartilage, son expression augmente jusqu'au grade 4 puis diminue. Le mNGF est aussi détecté dans l'os trabéculaire, le pic d'expression est au grade 5.

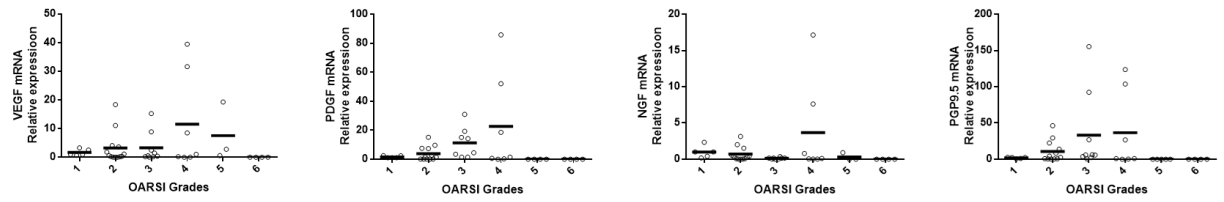
Dans l'os sous-chondral le mNGF s'exprime dans les stades tardifs de l'arthrose et augmente avec l'aggravation du score OARSI

V.4 Expression de l'ARN messenger PGP9.5 (mPGP9.5)

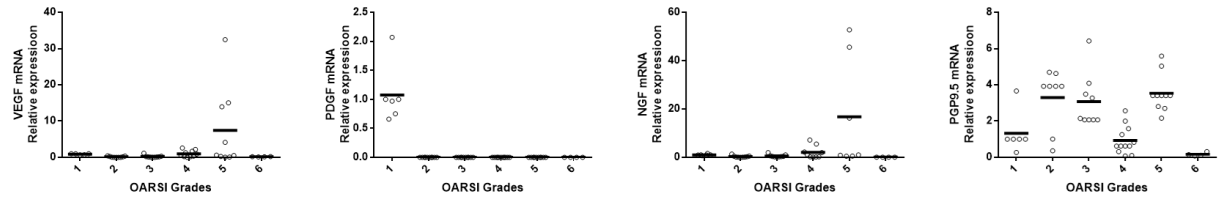
Le mPGP9.5 est détecté dans le cartilage, son expression augmente jusqu'au grade 4 puis diminue. L'expression du mPGP9.5 est variable dans l'os sous-chondral et trabéculaire, on le retrouve sur les cinq premiers grades OARSI.

Expression relative des ARNm

Cartilage



Os sous-chondral



Os trabéculaire

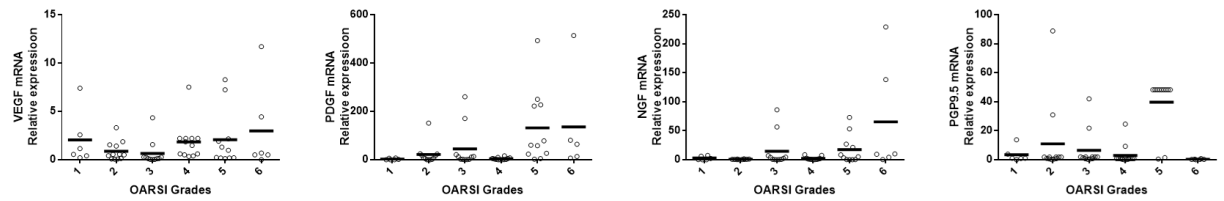


Figure 8: Expression relative des ARNm VEGF, PDGF, NGF et PGP9.5 en fonction du score OARSI dans le cartilage, l'os sous-chondral et trabéculaire.

VI. Dot-Blot

Afin de vérifier la présence de marqueurs protéiques de vascularisation et d'innervation, nous avons effectué des essais préliminaires en Dot-blot.

Nous avons séparé le cartilage, l'os sous-chondral et l'os trabéculaire et nous avons extrait les protéines totales de chaque tissu.

Nous avons ciblé le NGF et la Substance P (SP) pour l'innervation, le VEGF pour la vascularisation et l'IL1 β pour l'inflammation.

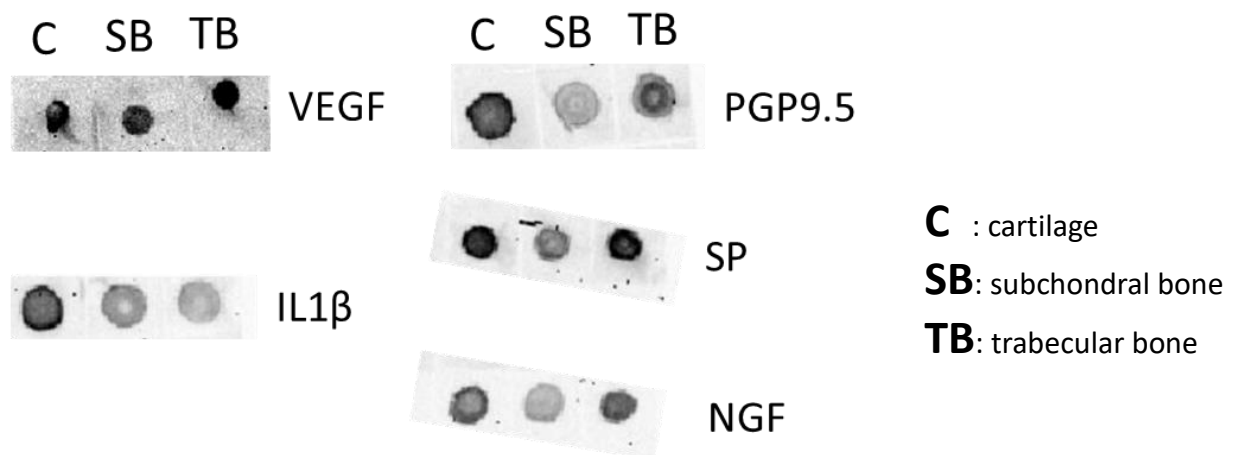


Figure 15 : Analyse en Dot blot de marqueurs neurovasculaires et inflammatoire.

Discussion

La première partie de cette étude s'est concentrée sur l'histomorphométrie du cartilage et de l'os sous-chondral dans différents stades d'arthrose chez l'Homme. Nous nous sommes basés sur une échelle à six grades pour différencier et identifier l'évolution de l'arthrose dans le cartilage et l'os sous-chondral et nous avons testé sa corrélation avec les paramètres histomorphométriques mesurés.

L'épaississement de l'os sous-chondral observé lors de cette étude était fortement lié à l'aggravation de la gonarthrose. L'épaississement de l'os sous-chondral est associé à un déséquilibre dans la balance du remodelage osseux. La formation d'os est plus forte entraînant la sclérose de la plaque sous-chondrale, la formation d'ostéophytes et influençant l'équilibre du remodelage au niveau de l'os trabéculaire [122]. Les modifications subies par l'os sous-chondral sont associées à une activation du cycle du remodelage osseux, les paramètres biomécaniques sont altérés et l'articulation répond, probablement, en essayant de réparer les dommages dus à la pathologie [123]. Il a déjà été montré qu'un fort remodelage osseux peut affecter significativement les propriétés de l'os sous-chondral [124].

Les mesures de la surface et de l'épaisseur articulaire montrent une forte corrélation négative avec l'avancement de la gonarthrose. Lors du développement de l'arthrose le cartilage articulaire subit des modifications biochimiques le menant à une dégradation drastique et actuellement irréversible. Les chondrocytes sont activés, leur phénotype change, il en résulte une fibrillation et une dégradation de la matrice du cartilage, les chondrocytes forment des clusters, la tidemark avance en même temps que cartilage se calcifie. Les protéinases sont suractivées, elles dégradent la matrice produisant des composés cataboliques qui exacerbent la perte du cartilage, la différenciation des chondrocytes hypertrophiques et accentuent l'apoptose [125].

L'épaississement du cartilage calcifié est détecté tôt dans l'évolution de l'arthrose. Les résultats de notre étude histologique montrent que le cartilage calcifié est le premier tissu à subir des modifications significatives. Il s'épaissit au grade 2 jusqu'au grade trois puis se résorbe en parallèle du cartilage hyalin jusqu'à disparaître aux grades cinq et six. De plus, les chondrocytes articulaires subissent une apoptose et la matrice se dégrade [126]. Simultanément, une calcification active est déclenchée dans l'os sous-chondral, entraînant la formation d'une plaque osseuse sous-chondrale plus épaisse [127].

La perméabilité du cartilage calcifié est cinq fois moindre que celle du cartilage non calcifié [106, 128] suggérant que le cartilage calcifié est un tissu qui a un rôle dans les échanges physiologiques entre les compartiments tissulaires de l'os et du cartilage.

L'épaississement de cette zone d'échanges physiologiques peut clairement contribuer aux tentatives de réparations entreprises par l'articulation afin de pallier aux dégâts induits par l'arthrose.

Lors de ces travaux, nous avons mesuré un paramètre qui n'est pas retrouvé dans la littérature. Nous avons appelé ce paramètre l'épaisseur ostéochondrale (Esc), il résulte de la mesure de l'épaisseur allant de la surface articulaire au début des trabécules osseuses. Nous avons trouvé intéressant que cette mesure reste inchangée lors du développement de l'arthrose, c'est-à-dire que l'épaisseur de l'unité cartilage/ os sous-chondral est significativement la même, les travées osseuses sont toujours à la même distance de la capsule synoviale, qu'elles soient séparées par de l'os et du cartilage (grades 1, 2,3 et 4) ou seulement par de l'os (grade 5 et 6). On peut retrouver ce même résultat dans l'étude de *Aho et al*, si on additionne leur mesure d'épaisseur de l'os sous-chondral et du cartilage articulaire, on retrouvera un Eos de 2500 mm équivalent au nôtre [129]. On pourrait répondre à l'une des questions essentielles concernant l'évolution de l'arthrose, c'est-à-dire, est-ce l'os ou le cartilage qui initie la pathologie ?, en prenant en compte des images d'histologies montrant des segments de cartilage coincés ou encerclés dans de l'os, observés sur nos coupes histologiques et aussi reportés par *Aho et al*, et le fait que l'Eos soit inchangée, on peut imaginer que c'est l'os sous-chondral qui aurait tendance à envahir le cartilage.

Cette idée peut aussi être confortée par les résultats d'invasion vasculaire obtenus lors de ces travaux.

La vascularisation de l'os sous-chondral et du cartilage calcifié semble être une caractéristique commune, elle est présente même chez des sujets sains [35]. Différents auteurs s'accordent sur une augmentation de la vascularisation à la jonction ostéochondrale durant le processus arthrosique, nos résultats ne les rejoignent pas [35, 130]. Notre décompte des cônes vasculaires montre que la vascularisation de l'os sous-chondral est présente de manière très variable à tous les stades d'arthrose et elle diminue significativement au dernier stade. Nos méthodes d'analyse ne sont pas les mêmes, leurs mesures n'étaient qu'indirectes en évaluant l'expression de facteurs angiogéniques tels que le VEGF et l'angiopoteine (ANG)

majoritairement sur des modèles murins, quand nous nous sommes intéressés aux vaisseaux sanguins chez l'Homme directement.

L'étude de *Walsh et al* et son décompte de vaisseaux sanguins est la plus proche de la nôtre, on retrouve un décompte des vaisseaux sanguins au niveau de la jonction ostéochondrale. *Walsh et al* rapportent une augmentation du nombre de vaisseaux en fonction de la détérioration du cartilage. En regardant de plus près leurs résultats, on retrouve la grande variabilité du nombre de vaisseaux observés dans notre étude. De plus, l'augmentation du nombre de vaisseaux observés, lors de l'étude, ne repose que sur deux points de mesures aux grades 12 et 14 [103].

Nos résultats sur l'invasion vasculaire peuvent nous conforter par rapport à l'ossification du cartilage. La vascularisation est nécessaire lors de l'ossification endochondrale, mécanisme d'ossification primaire qui permet la croissance de l'os au niveau des épiphyses des os longs, ce mécanisme transforme le cartilage en os. D'après nos résultats, la vascularisation est constante durant l'arthrose, elle pourrait supporter cette ossification ostéochondrale qui favorise la différenciation des chondrocytes hypertrophiques qui secrètent du collagène type X qui est retrouvé dans les stades avancés d'arthrose. Ces mêmes chondrocytes hypertrophiques secrètent des facteurs angiogéniques tel que le VEGF permettant l'entretien du processus d'ossification. [131].

La vascularisation est aussi liée aux mécanismes de réparations tissulaires, lors du développement de l'arthrose l'articulation tente de réparer le cartilage atteint, sans réussite. Au stade d'arthrose le plus élevé le cartilage a disparu, les tentatives de réparation via la vascularisation ont échoué ([132], entre-temps l'os sous-chondral s'épaissit dû à un remodelage osseux accru par l'apport sanguin, sa rigidité entrave la vascularisation et le nombre de cônes sanguins baisse [130].

On sait que l'os sous-chondral devient plus sclérotique dans l'arthrose [110], mais il existe peu de preuves d'où les premiers changements microstructuraux de l'arthrose commencent réellement dans le cartilage ou l'os sous-chondral. Bien que nous ayant émis une hypothèse sur cette question de longue date, elle reste néanmoins sujette à débat.

Nos résultats indiquent que les modifications de l'os sous-chondral sont fortement couplées à la dégénérescence du cartilage articulaire depuis les stades OARSI les plus faibles. Les paramètres morphométriques de la plaque sous-chondrale et de l'os trabéculaire ont été

évalués séparément en raison de leurs structures et des fonctions spécifiques conduisant à une adaptation éventuellement différente à l'arthrose dans ces compartiments [14]. Nos résultats indiquent que des altérations liées à l'arthrose sont présentes dans les deux.

Nos résultats ont montré un volume de fraction osseuse trabéculaire plus élevé avec l'arthrose en raison d'un nombre et d'une épaisseur de trabécules plus élevés et d'une séparation trabéculaire plus faible. Dans cette étude, l'un des paramètres morphologiques calculés était le SMI. Cette mesure donne une estimation de la forme des structures trabéculaires, structure en forme de plaque ou plutôt tige. Ici, nous avons observé une corrélation négative entre le SMI et le grade OARSI, correspondant à une apparence semblable à une plaque de trabécules dans l'arthrose avancée. Cette constatation était semblable à une étude sur un modèle animal de cochon d'Inde développant la pathologie spontanément [133, 134] et aussi lors d'études humaines [135-137]. On peut considérer ces changements de l'os trabéculaire comme étant une adaptation à l'arthrose. L'os trabéculaire peut augmenter sa rigidité et sa force en modifiant sa structure pour résister à une charge plus élevée due au cartilage perte [138, 139].

Pour la plaque sous-chondrale et l'os trabéculaire, la surface osseuse spécifique a diminué avec l'arthrose. Ce paramètre correspond au rapport de la surface osseuse par volume, ce qui suggère que les surfaces osseuses deviennent plus uniformes dans l'os trabéculaire et plus lisses dans la plaque sous-chondrale avec un grade OARSI croissant. Dans une étude récente, une grande variation de l'épaisseur de la plaque sous-chondrale a été observée chez les genoux sains et arthrosiques, avec une tendance vers une augmentation de la densité de la plaque [140]. Comme prévu, la plaque osseuse sous-chondrale est devenue plus épaisse en fonction du grade OARSI et cette relation était fortement corrélée. Dans une étude récente *Finnilä et al* ont mesuré l'épaisseur du cartilage calcifié et de l'os sous-chondral sur des lames histologiques colorées au trichrome de Masson et l'ont comparée à l'épaisseur mesurée par μ CT. Dans leur étude, ils déduisent que le cartilage calcifié est inclus dans la mesure de l'épaisseur en μ CT. Ils proposent aussi que les premiers changements dans l'arthrose seraient dus à la progression de la tidemark ce qui rend le cartilage hyalin plus mince et permet l'épaississement et le raidissement de la plaque sous-chondrale, ce qui augmente le stress dans le cartilage.

Dans l'arthrose, la résorption ostéoclastique est accrue dans l'os sous-chondral et peut s'étendre au cartilage calcifié, augmentant la porosité de la plaque sous-chondrale et le passage de liquide et de petites molécules [141-143]. Dans les modèles post-traumatiques

d'arthrose, le remodelage osseux accéléré a été observé avec un nombre accru d'ostéoclastes et d'ostéoïdes dans l'os sous-chondral, augmentant sa perméabilité [144]. Nos résultats ont montré une forte corrélation entre l'épaisseur des structures minéralisées et l'OARSI. Cependant, le rôle de la tidemark dans la pathogenèse de l'arthrose n'est toujours pas clair et devrait être examiné [145].

Lors de cette étude nous avons corrélé les résultats histomorphométriques entre l'os trabéculaire, sous-chondral et le cartilage hyalin.

Nous avons comparé les résultats histologiques de l'os sous-chondral et du cartilage articulaire. La surface du cartilage et l'épaisseur du cartilage diminuent, en parallèle l'os sous-chondral s'étend. Les corrélations entre ces deux tissus reflètent l'agressivité de la pathologie sur l'articulation et les liens reliant l'endommagement du cartilage et l'épaississement de l'os sous-chondral.

Dans le même sens, en croisant les données de μ CT et d'histologie, on trouve deux paramètres histologiques corrélés avec tous les paramètres μ CT. Ces deux paramètres sont le score OARSI et l'épaisseur sous-chondrale appuyant la forte relation existant entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire.

En effet, l'épaississement de l'os sous-chondral impacte les paramètres morphologiques tels que TbTh, et TbN qui sont plus élevés et TbSp et BS / BV qui diminuent expliquant l'augmentation de BV / TV. Ces résultats suggèrent un déséquilibre dans le remodelage osseux favorisant une formation osseuse. Des études traitant des paramètres histomorphométriques de l'os arthrosique, montrent des résultats discordants. Pour le stade le plus élevé de la dégénérescence cartilagineuse, *Bobinac et al* [135] ont trouvé dans les plateaux tibiaux une augmentation significative de la TbTh et une diminution de la TbSp sans différence de TbN. *Kamibayashi et al* [146] ont trouvé des trabécules plus petites dans l'os sous-chondral des plateaux tibiaux, plus espacées et plus épaisses dans l'arthrose comparativement aux témoins. Dans l'arthrose sévère de la tête fémorale prélevée lors d'une chirurgie de remplacement de la hanche, *Fazzalari et Parkinson* [147] ont constaté que le volume de l'os trabéculaire augmentait principalement par une augmentation de la TbN et une réduction de la TbSp plutôt qu'un épaississement des trabécules.

Plusieurs travaux rapportent une évidence croissante que l'os sous-chondral joue un rôle important dans l'étiologie de l'arthrose [148, 149], mais les études jusqu'ici ne fournissent pas une vue cohérente sur ce sujet. Les modifications de l'os sous-chondral ont été étudiées chez l'Homme atteint d'arthrose et dans des modèles animaux. Comme dans notre étude chez l'homme, il a déjà été reporté une augmentation de la fraction volumique de l'os trabéculaire et l'épaisseur trabéculaire a été trouvée [135, 150], ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la plaque sous-chondrale [150]. Cependant, d'autres études ont montré une diminution de la fraction volumique osseuse et de l'épaisseur trabéculaire chez les patients atteints d'arthrose [47, 151] ou une diminution de la raideur [152, 153]. La limite des études sur les humains est qu'elles étudient une arthrose sévère déjà établie. Des données longitudinales montrant les changements depuis le début jusqu'à l'apparition de symptômes ostéoarthritiques cliniques complets n'existent pas.

L'étude de *Sniekers et al* [154] donne une idée sur le questionnement irrésolu concernant l'évolution de l'os sous-chondral aux stades précoces de l'arthrose. Ils utilisent deux modèles d'arthrose canine chirurgicale ; la rupture du ligament croisé et la création de rainures (groove) dans le cartilage.

Ils montrent la diminution constante de l'épaisseur de la plaque sous-chondrale produite trois semaines après la chirurgie dans le modèle rainure, alors que les modifications du cartilage étaient très faibles à ce point précoce. Ils suggèrent que les changements de la plaque sous-chondrale se produisent rapidement. Cela indiquerait (au moins dans le modèle de rainures) une interaction entre le cartilage et la plaque sous-chondrale qui induit la résorption osseuse comme conséquence de l'endommagement du cartilage induit par les rainures. Lors des prémices de l'arthrose, l'amincissement et la porosité considérablement accrue de la plaque sous-chondrale peuvent faciliter l'invasion vasculaire du cartilage et la diffusion des molécules du cartilage endommagé à travers la plaque sous-chondrale et vice-versa, améliorant ainsi la communication biochimique entre l'os et le cartilage [153]. Il n'est pas clair si cette communication du cartilage-os interagit avec une activité de réparation intrinsèque du cartilage [155] ou joue un rôle dans la progression de la maladie [156].

L'une des problématiques de l'arthrose est qu'il n'y a pas de critères objectifs qui indiquent une arthrose précoce avec des signes précliniques légers et, par conséquent, la conception d'études longitudinales est difficile.

Les modifications de l'os et du cartilage reposent sur un environnement physiologique propre. Nous avons voulu suivre l'évolution neurovasculaire en mesurant l'expression de transcrits vasculaires VEGF et PDGF et neural NGF et PGP9.5.

Le VEGF stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales et stabilise les vaisseaux sanguins nouvellement formés, alors que le PDGF recrute des péricytes et des cellules musculaires lisses, conduisant à la maturation vasculaire [157]. La croissance des nerfs sensoriels est stimulée par le facteur de croissance nerveux (NGF) [35, 158]. Le NGF peut également stimuler l'angiogenèse, démontrant le lien souvent étroit entre la vascularisation et l'innervation [158].

Nous avons émis l'hypothèse que l'angiogenèse et l'innervation ostéochondrale sont dirigées par des facteurs de croissance produits par les cellules du cartilage, de l'os sous-chondral et trabéculaire avec des proportions différentes. En comparant nos échantillons tibiofémoraux de patients atteints d'arthrose, nous avons voulu caractériser le milieu cellulaire ostéochondral et étudier les associations possibles avec la croissance neurovasculaire.

Nous avons établi des tendances de l'expression des transcrits. Les transcrits neurovasculaires sont détectés dans le cartilage articulaire alors que ce dernier est normalement insensible. De nombreux patients atteints d'arthrose décrivent une douleur brûlante persistante, caractéristique d'une douleur médiée par de fines fibres nerveuses afférentes amyélinisées. Les nerfs non myélinisés sont le plus souvent périvasculaires. L'innervation a été décrite en détail dans la synovie des genoux des patients atteints d'arthrose, et aussi dans le périoste, les ménisques, les ligaments croisés et collatéraux, et dans la capsule articulaire [35]. Dans l'os sous-chondral et trabéculaire les transcrits neurovasculaires sont aussi détectés avec une tendance à l'augmentation avec l'aggravation de l'arthrose.

Nos résultats montrent des profils d'expressions discutables. Les tissus calcifiés du genou sont plus difficiles à étudier en raison des limitations techniques lors des conservations des plateaux tibiaux une fois extraits du patient mais aussi de l'absence de protocole ou de kit d'extraction d'acides nucléiques de référence pour ce genre de tissu.

C'est sur ces derniers résultats que mon travail de thèse s'est achevé. Nous avons utilisé différentes méthodes afin d'avoir la meilleure compréhension possible des aspects de cette pathologie complexe qu'est l'arthrose.

Conclusion

L'os sous-chondral et le cartilage articulaire forme une unité fonctionnelle malléable. Elle répond au stress de charge (ref), aux modifications physiologiques (ref inflammation, obésité) et s'adaptent afin de maintenir ces fonctions biomécaniques.

Lors de ce travail, nous avons montré que l'unité ostéochondrale maintient son épaisseur lors de la gonarthrose.

Ce sont les zones calcifiées qui répondent en premier lors de la gonarthrose. En l'occurrence, ce sont les couches profondes du cartilage qui sont les premières à se modifier. Le cartilage calcifié se minéralise et son épaisseur augmente en réponse à la dégradation du cartilage articulaire. L'épaississement du cartilage calcifié baisse au stade intermédiaire de l'arthrose et l'os sous-chondral prend le relai des adaptations morphologiques.

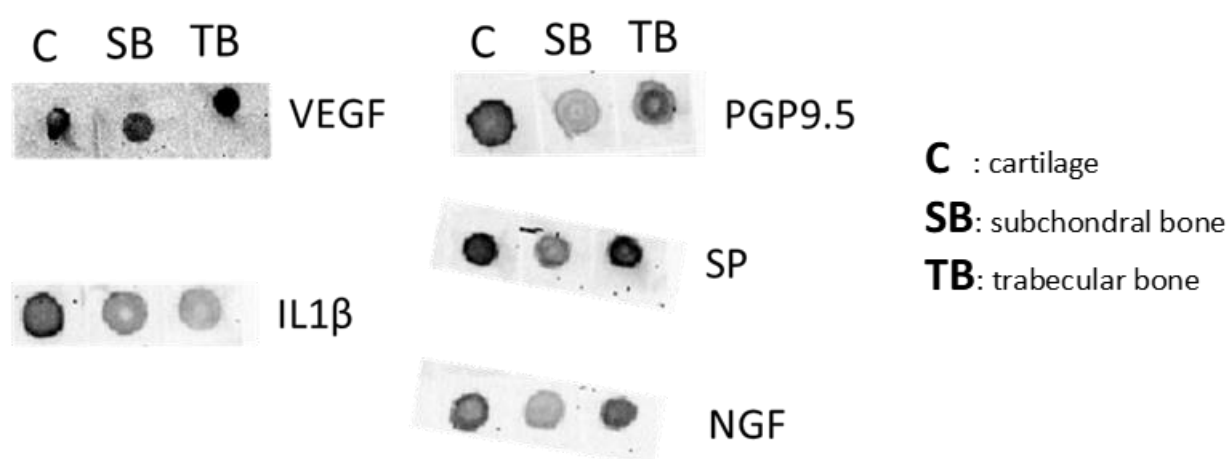
La plaque de l'os sous-chondral s'épaissit et maintient l'épaisseur ostéo-articulaire, d'environ 1500µm, jusqu'au dernier stade d'arthrose.

Ce qui était de l'os trabéculaire se densifie, les trabécules s'épaississent et élargissent la plaque sous-chondral.

Ces adaptations sont supportées par une activité physiologique accrue. Des marqueurs neurovasculaires sont retrouvés sur les trois niveaux de nos échantillons.

Un test rapide en Dot-Blot sur un échantillon d'arthrose modérée montre la présence de marqueurs liés à la vascularisation, l'innervation et l'inflammation.

La substance P (SP) est un neuropeptide lié à la douleur et à l'inflammation. La SP a été



impliquée dans la douleur articulaire et l'inflammation dans des modèles animaux mais aussi chez l'homme [159]. Beaucoup de patients atteints d'arthrose décrivent une douleur brûlante

au niveau de l'articulation. La douleur dans l'arthrose peut provenir de plusieurs sources, y compris l'os sous-chondral [160].

L'IL1 β possède plusieurs caractéristiques biochimiques lui permettant d'être impliquée dans l'initiation et la progression de l'arthrose. L'IL1 β peut initier une cascade d'événements intracellulaires pouvant aboutir à l'activation de protéases, la création d'un milieu articulaire délétère, supprimant des voies anaboliques et diminuant la synthèse de la matrice extracellulaire du cartilage. Elle influe aussi sur l'os sous-chondral en dirigeant les ostéoblastes vers un phénotype sclérotique [161].

Ces biomarqueurs montrent que la neurovascularisation et l'inflammation au niveau de la jonction ostéochondrale peuvent être une cible prometteuse pour le traitement de l'arthrose.

Malgré l'importance de l'os sous-chondral dans l'arthrose, qui est reconnue depuis plus de quatre décennies, la compréhension de l'évolution de l'arthrose à son niveau est loin d'être satisfaisante. La physiopathologie de l'os sous-chondral dans l'arthrose justifie un examen plus approfondi. Ce n'est que grâce à une meilleure compréhension et appréciation du rôle de cette structure souvent négligée dans le développement et la progression de l'arthrose que nous serons en mesure de prévenir, diagnostiquer et traiter efficacement cette maladie.

Bibliographie

1. <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>.
2. Berenbaum, F., *Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)*. Osteoarthritis and Cartilage. **21**(1): p. 16-21.
3. Mobasheri, A., et al., *Osteoarthritis Year in Review 2016: biomarkers (biochemical markers)*. Osteoarthritis and Cartilage. **25**(2): p. 199-208.
4. Grange, L., et al., *Osteoarthritis in France the cost of ambulatory care in 2010*. Osteoarthritis and Cartilage, 2012. **20**: p. S163.
5. Guillemin, F., et al., *Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-based survey*. Osteoarthritis Cartilage, 2011. **19**(11): p. 1314-22.
6. Felson, D.T., et al., *Osteoarthritis: New insights. part 1: the disease and its risk factors*. Annals of Internal Medicine, 2000. **133**(8): p. 635-646.
7. Van Saase, J., et al., *Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations*. Annals of the rheumatic diseases, 1989. **48**(4): p. 271-280.
8. Oliveria, S.A., et al., *Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization*. Arthritis & Rheumatology, 1995. **38**(8): p. 1134-1141.
9. Sacks, J.J., C.G. Helmick, and G. Langmaid, *Deaths from arthritis and other rheumatic conditions, United States, 1979-1998*. J Rheumatol, 2004. **31**(9): p. 1823-8.
10. Solignac, M., *[COART France 2003 report on new socioeconomic data on osteoarthritis in France]*. Presse medicale (Paris, France: 1983), 2004. **33**(9 Pt 2): p. S4-6.
11. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports health, 2009. **1**(6): p. 461-468.
12. Buckwalter, J.A., *Articular cartilage: injuries and potential for healing*. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy, 1998. **28**(4): p. 192-202.
13. Mankin, H.J., *The response of articular cartilage to mechanical injury*. J Bone Joint Surg Am, 1982. **64**(3): p. 460-466.
14. Madry, H., C.N. van Dijk, and M. Mueller-Gerbl, *The basic science of the subchondral bone*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18**(4): p. 419-33.
15. Duncan, H., et al., *The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study*. J Bone Joint Surg Am, 1987. **69**(8): p. 1212-20.
16. Finnilä, M.A., et al., *Association between subchondral bone structure and osteoarthritis histopathological grade*. Journal of Orthopaedic Research, 2017. **35**(4): p. 785-792.
17. Noble, P., et al. *The synovial joint: a perfect tribological system*. in *Annales de Médecine Vétérinaire*. 2010. Annales de Médecine Vétérinaire.
18. Lipowitz, A.J. and C.D. Newton, *Degenerative joint disease and traumatic arthritis*. Textbook of small animal orthopaedics, International Veterinary Information Service, Ithaca, 1985.
19. Cornelius, C.E. and J.J. Kaneko, *Clinical biochemistry of domestic animals*. Clinical biochemistry of domestic animals., 1963.
20. Schmidt, T.A., et al., *Boundary lubrication of articular cartilage: role of synovial fluid constituents*. Arthritis & Rheumatology, 2007. **56**(3): p. 882-891.
21. Waller, K.A., et al., *Role of lubricin and boundary lubrication in the prevention of chondrocyte apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(15): p. 5852-5857.
22. Blewis, M., et al., *A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints*. Eur Cell Mater, 2007. **13**: p. 26-39.

23. Altman, R.D. and G.E. Gold, *Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15 Suppl A**: p. A1-56.
24. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthritis*. Ann Rheum Dis, 1957. **16**(4): p. 494-502.
25. Javaid, M.K., et al., *Changes in proximal femoral mineral geometry precede the onset of radiographic hip osteoarthritis: The study of osteoporotic fractures*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(7): p. 2028-36.
26. Duryea, J., et al., *Comparison of radiographic joint space width to MRI cartilage morphometry: analysis of longitudinal data from the Osteoarthritis Initiative (OAI)*. Arthritis care & research, 2010. **62**(7): p. 932.
27. Hayashi, D., F.W. Roemer, and A. Guermazi, *Imaging for osteoarthritis*. Annals of physical and rehabilitation medicine, 2016. **59**(3): p. 161-169.
28. Guermazi, A., et al., *Prevalence of abnormalities in knees detected by MRI in adults without knee osteoarthritis: population based observational study (Framingham Osteoarthritis Study)*. Bmj, 2012. **345**: p. e5339.
29. Amin, S., et al., *The relationship between cartilage loss on magnetic resonance imaging and radiographic progression in men and women with knee osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2005. **52**(10): p. 3152-3159.
30. Madelin, G., et al., *Articular cartilage: evaluation with fluid-suppressed 7.0-T sodium MR imaging in subjects with and subjects without osteoarthritis*. Radiology, 2013. **268**(2): p. 481-491.
31. Wu, P.-T., et al., *Pain in patients with equal radiographic grades of osteoarthritis in both knees: the value of gray scale ultrasound*. Osteoarthritis and Cartilage, 2012. **20**(12): p. 1507-1513.
32. Guermazi, A., et al., *Assessment of synovitis with contrast-enhanced MRI using a whole-joint semiquantitative scoring system in people with, or at high risk of, knee osteoarthritis: the MOST study*. Annals of the rheumatic diseases, 2011. **70**(5): p. 805-811.
33. Hunter, D., et al., *The association of meniscal pathologic changes with cartilage loss in symptomatic knee osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2006. **54**(3): p. 795-801.
34. Hunter, D., et al., *Definition of osteoarthritis on MRI: results of a Delphi exercise*. Osteoarthritis and Cartilage, 2011. **19**(8): p. 963-969.
35. Suri, S., et al., *Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 2007. **66**(11): p. 1423-1428.
36. Martel, G., et al., *Differences in the vascular tree of the femoral trochlear growth cartilage at osteochondrosis-susceptible sites in foals revealed by SWI 3T MRI*. Journal of Orthopaedic Research, 2016.
37. Mankin, H.J., M. Johnson, and L. Lippiello, *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. III. Distribution and metabolism of amino sugar-containing macromolecules*. J Bone Joint Surg Am, 1981. **63**(1): p. 131-139.
38. Pritzker, K.P., et al., *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(1): p. 13-29.
39. Rae, P.J., J. Noble, and J.P. Hodgkinson, *Patellar resurfacing in total condylar knee arthroplasty. Technique and results*. J Arthroplasty, 1990. **5**(3): p. 259-65.
40. Cameron, M.L., K.K. Briggs, and J.R. Steadman, *Reproducibility and reliability of the outerbridge classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically*. Am J Sports Med, 2003. **31**(1): p. 83-6.

41. Pritzker, K., et al., *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging*. Osteoarthritis and cartilage, 2006. **14**(1): p. 13-29.
42. Damjanov, I., *Pathology for the health-related professions*. 2000: WB Saunders Company.
43. Gryn timer, M., et al., *Subchondral bone in osteoarthritis*. Calcified tissue international, 1991. **49**(1): p. 20-26.
44. Scanzello, C.R., A. Plaas, and M.K. Crow, *Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound?* Current opinion in rheumatology, 2008. **20**(5): p. 565-572.
45. Muller, R., *Hierarchical microimaging of bone structure and function*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(7): p. 373-81.
46. Boerckel, J.D., et al., *Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering*. Stem cell research & therapy, 2014. **5**(6): p. 144.
47. Patel, V., et al., *MicroCT evaluation of normal and osteoarthritic bone structure in human knee specimens*. Journal of Orthopaedic Research, 2003. **21**(1): p. 6-13.
48. Odgaard, A., *Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture*. Bone, 1997. **20**(4): p. 315-328.
49. Rueggsegger, P., B. Koller, and R. Muller, *A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture*. Calcified tissue international, 1996. **58**(1): p. 24-29.
50. Ding, M., *Age variations in the properties of human tibial trabecular bone and cartilage*. Acta Orthopaedica Scandinavica, 2000. **71**(sup292): p. i-45.
51. Ding, M. and I. Hvid, *Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone*. Bone, 2000. **26**(3): p. 291-295.
52. Layton, M.W., et al., *Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography*. Arthritis & Rheumatism, 1988. **31**(11): p. 1400-1405.
53. Dedrick, D.K., et al., *A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months*. Arthritis & Rheumatology, 1993. **36**(10): p. 1460-1467.
54. Ding, M., et al. *Deterioration in the quality of tibial cancellous bone in early stage human osteoarthrosis*. in *47th annual meeting ORS*. 2001.
55. Hahn, M., et al., *Trabecular bone pattern factor—a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture*. Bone, 1992. **13**(4): p. 327-330.
56. Odgaard, A. and H. Gundersen, *Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions*. Bone, 1993. **14**(2): p. 173-182.
57. Pothuaud, L., et al., *Fractal Dimension of Trabecular Bone Projection Texture Is Related to Three-Dimensional Microarchitecture*. Journal of Bone and Mineral Research, 2000. **15**(4): p. 691-699.
58. Fenwick, S.A., P.J. Gregg, and P. Rooney, *Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular*. Osteoarthritis Cartilage, 1999. **7**(5): p. 441-52.
59. Pufe, T., et al., *The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(5): p. 1082-8.
60. Semble, E.L., R.A. Turner, and E.L. McCrickard, *Rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fluid effects on primary human endothelial cell cultures*. J Rheumatol, 1985. **12**(2): p. 237-41.

61. Enomoto, H., et al., *Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage*. The American journal of pathology, 2003. **162**(1): p. 171-181.
62. Brown, R.A. and J.B. Weiss, *Neovascularisation and its role in the osteoarthritic process*. Ann Rheum Dis, 1988. **47**(11): p. 881-5.
63. Botter, S., et al., *ADAMTS5^{-/-} mice have less subchondral bone changes after induction of osteoarthritis through surgical instability: implications for a link between cartilage and subchondral bone changes*. Osteoarthritis and Cartilage, 2009. **17**(5): p. 636-645.
64. Walsh, D.A., et al., *Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma*. Histochem J, 1996. **28**(11): p. 759-69.
65. Jimenez-Andrade, J.M., et al., *Preventive or late administration of anti-NGF therapy attenuates tumor-induced nerve sprouting, neuroma formation, and cancer pain*. Pain, 2011. **152**(11): p. 2564-74.
66. Ashraf, S., et al., *Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(3): p. 523-9.
67. Mapp, P.I. and D.A. Walsh, *Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(7): p. 390-8.
68. Lehner, B., et al., *Preponderance of sensory versus sympathetic nerve fibers and increased cellularity in the infrapatellar fat pad in anterior knee pain patients after primary arthroplasty*. J Orthop Res, 2008. **26**(3): p. 342-50.
69. Ferrell, W.R. and N.J. Russell, *Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre afferents of the anaesthetized cat*. J Physiol, 1986. **379**: p. 407-16.
70. Levine, J.D., et al., *Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis*. Science, 1984. **226**(4674): p. 547-9.
71. Fan, T.P., et al., *Stimulation of angiogenesis by substance P and interleukin-1 in the rat and its inhibition by NK1 or interleukin-1 receptor antagonists*. Br J Pharmacol, 1993. **110**(1): p. 43-9.
72. Leibrock, J., et al., *Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor*. Nature, 1989. **341**(6238): p. 149-52.
73. Minnone, G., F. De Benedetti, and L. Bracci-Laudiero, *NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(5).
74. Aloe, L. and L. Calzà, *NGF and related molecules in health and disease*. Vol. 146. 2003: Elsevier.
75. Gigante, A., et al., *Expression of NGF, Trka and p75 in human cartilage*. European journal of histochemistry: EJH, 2003. **47**(4): p. 339.
76. Kojima, M., T. Ikeuchi, and H. Hatanaka, *Role of nerve growth factor in the expression of trkA mRNA in cultured embryonic rat basal forebrain cholinergic neurons*. J Neurosci Res, 1995. **42**(6): p. 775-83.
77. Sofroniew, M.V., C.L. Howe, and W.C. Mobley, *Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 1217-81.
78. Gee, A.P., et al., *Nerve growth factor: stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(23): p. 7215-8.
79. Otten, U., J.B. Baumann, and J. Girard, *Nerve growth factor induces plasma extravasation in rat skin*. Eur J Pharmacol, 1984. **106**(1): p. 199-201.
80. Seidel, M.F., B.L. Wise, and N.E. Lane, *Nerve growth factor: an update on the science and therapy*. Osteoarthritis Cartilage, 2013. **21**(9): p. 1223-8.
81. Bonnet, C.S. and D.A. Walsh, *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(1): p. 7-16.

82. Conrozier, T., et al., *Increased serum C-reactive protein levels by immunonephelometry in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis*. Rev Rhum Engl Ed, 1998. **65**(12): p. 759-65.
83. Spector, T.D., et al., *Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(4): p. 723-7.
84. Smith, R.J., et al., *Induction of neutral proteinase and prostanoid production in bovine nasal chondrocytes by interleukin-1 and tumor necrosis factor α : modulation of these cellular responses by interleukin-6 and platelet-derived growth factor*. Clinical immunology and immunopathology, 1992. **64**(2): p. 135-144.
85. Sandy, J.D. and M.W. Lark, *Proteolytic degradation of normal and osteoarthritic cartilage matrix*. Osteoarthritis, 2003. **2**: p. 82-92.
86. Ollivierre, F., et al., *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**(3): p. 904-11.
87. Berenbaum, F., *Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)*. Osteoarthritis and Cartilage, 2013. **21**(1): p. 16-21.
88. Kim, H.A., et al., *The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes*. Arthritis & Rheumatism, 2006. **54**(7): p. 2152-2163.
89. van Lent, P.L., et al., *Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2012. **64**(5): p. 1466-1476.
90. Sohn, D.H., et al., *Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4*. Arthritis research & therapy, 2012. **14**(1): p. 1.
91. Nair, A., et al., *Synovial fluid from patients with early osteoarthritis modulates fibroblast-like synoviocyte responses to Toll-like receptor 4 and Toll-like receptor 2 ligands via soluble CD14*. Arthritis & Rheumatism, 2012. **64**(7): p. 2268-2277.
92. Scanzello, C., et al., *Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease*. Osteoarthritis and Cartilage, 2009. **17**(8): p. 1040-1048.
93. Coppé, J.-P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annual review of pathology, 2010. **5**: p. 99.
94. Forsyth, C.B., et al., *Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli*. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 2005. **60**(9): p. 1118-1124.
95. Lotz, M. and R.F. Loeser, *Effects of aging on articular cartilage homeostasis*. Bone, 2012. **51**(2): p. 241-8.
96. Rasheed, Z., N. Akhtar, and T.M. Haqqi, *Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in human osteoarthritis chondrocytes*. Rheumatology, 2010: p. 380.
97. Radin, E.L. and R.M. Rose, *Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage*. Clin Orthop Relat Res, 1986(213): p. 34-40.
98. Hayami, T., et al., *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 & Rheumatism, 2004. **50**(4): p. 1193-1206.

99. Milz, S. and R. Putz, *Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau*. J Anat, 1994. **185 (Pt 1)**: p. 103-10.
100. Berry, J.L., D.A. Thaeler-Oberdoerster, and A.S. Greenwald, *Subchondral pathways to the superior surface of the human talus*. Foot Ankle, 1986. **7(1)**: p. 2-9.
101. Ahmed, A. and D. Burke, *In-vitro of measurement of static pressure distribution in synovial joints—Part I: Tibial surface of the knee*. Journal of biomechanical engineering, 1983. **105(3)**: p. 216-225.
102. Lane, L.B., A. Villacin, and P.G. Bullough, *The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon*. J Bone Joint Surg Br, 1977. **59(3)**: p. 272-8.
103. Walsh, D., et al., *Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis*. Osteoarthritis and cartilage, 2007. **15(7)**: p. 743-751.
104. Shibakawa, A., et al., *The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow*. Osteoarthritis and cartilage, 2005. **13(8)**: p. 679-687.
105. Lyons, T.J., et al., *The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces*. BMC Musculoskelet Disord, 2006. **7**: p. 52.
106. Pan, J., et al., *In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage*. Journal of Orthopaedic Research, 2009. **27(10)**: p. 1347-1352.
107. Arkill, K.P. and C.P. Winlove, *Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16(6)**: p. 708-14.
108. Henrotin, Y., L. Pesesse, and C. Sanchez, *Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects*. Osteoporosis International, 2012. **23(8)**: p. 847-851.
109. Lafage-Proust, M.H., et al., *Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling*. Bonekey Rep, 2015. **4**: p. 662.
110. Burr, D.B. and M.A. Gallant, *Bone remodelling in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8(11)**: p. 665-73.
111. Burr, D.B. and E.L. Radin, *Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthritis?* Rheumatic Disease Clinics, 2003. **29(4)**: p. 675-685.
112. Lajeunesse, D. and P. Reboul, *Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling*. Curr Opin Rheumatol, 2003. **15(5)**: p. 628-33.
113. Westacott, C.I., et al., *Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone*. Arthritis Rheum, 1997. **40(7)**: p. 1282-91.
114. Imhof, H., et al., *Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease*. Top Magn Reson Imaging, 1999. **10(3)**: p. 180-92.
115. Malinin, T. and E. Ouellette, *Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons*. Osteoarthritis and Cartilage, 2000. **8(6)**: p. 483-491.
116. Amin, A.K., et al., *Chondrocyte survival in articular cartilage: the influence of subchondral bone in a bovine model*. J Bone Joint Surg Br, 2009. **91(5)**: p. 691-9.
117. Jiao, K., et al., *Subchondral bone loss following orthodontically induced cartilage degradation in the mandibular condyles of rats*. Bone, 2011. **48(2)**: p. 362-371.
118. Johnstone, E.W., et al., *Metaphyseal factors promote calcium incorporation in physeal chondrocyte cultures*. Journal of orthopaedic science, 2000. **5(6)**: p. 593-599.
119. Moreno-Rubio, J., G. Herrero-Beaumont, and R. Largo, *Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E2 modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in*

- the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2010. **62**(2): p. 478-488.
120. Nurminskaya, M., et al., *Chondrocyte-derived transglutaminase promotes maturation of preosteoblasts in periosteal bone*. Developmental biology, 2003. **263**(1): p. 139-152.
 121. Maurer, C.R., R. Qi, and V. Raghavan, *A linear time algorithm for computing exact Euclidean distance transforms of binary images in arbitrary dimensions*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 2003. **25**(2): p. 265-270.
 122. Thambyah, A. and N. Broom, *On new bone formation in the pre-osteoarthritic joint*. Osteoarthritis and Cartilage, 2009. **17**(4): p. 456-463.
 123. Pastoureau, P., A. Chomel, and J. Bonnet, *Evidence of early subchondral bone changes in the meniscectomized guinea pig. A densitometric study using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis*. Osteoarthritis and Cartilage, 1999. **7**(5): p. 466-473.
 124. Lories, R.J. and F.P. Luyten, *The bone–cartilage unit in osteoarthritis*. Nature Reviews Rheumatology, 2011. **7**(1): p. 43-49.
 125. Goldring, M.B., *Articular cartilage degradation in osteoarthritis*. HSS Journal®, 2012. **8**(1): p. 7-9.
 126. Vrahas, M.S., K. Mithoefer, and D. Joseph, *The long-term effects of articular impaction*. Clinical orthopaedics and related research, 2004. **423**: p. 40-43.
 127. Madry, H., C.N. van Dijk, and M. Mueller-Gerbl, *The basic science of the subchondral bone*. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, 2010. **18**(4): p. 419-433.
 128. Arkill, K. and C. Winlove, *Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage*. Osteoarthritis and Cartilage, 2008. **16**(6): p. 708-714.
 129. Aho, O.-M., et al., *Subchondral bone histology and grading in osteoarthritis*. PloS one, 2017. **12**(3): p. e0173726.
 130. Findlay, D.M., *Vascular pathology and osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(12): p. 1763-8.
 131. Babarina, A.V., et al., *Role of the subchondral vascular system in endochondral ossification: endothelial cell-derived proteinases derepress late cartilage differentiation in vitro*. Matrix Biol, 2001. **20**(3): p. 205-13.
 132. Schutze, N., *Angiogenesis in Osteoarthritis*. Current Rheumatology Reviews, 2008. **4**(3): p. 206-209.
 133. Ding, M., C.C. Danielsen, and I. Hvid, *Age-related three-dimensional microarchitectural adaptations of subchondral bone tissues in guinea pig primary osteoarthrosis*. Calcified tissue international, 2006. **78**(2): p. 113-122.
 134. Wang, T., et al., *Spatial and temporal changes of subchondral bone proceed to microscopic articular cartilage degeneration in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 2013. **21**(4): p. 574-581.
 135. Bobinac, D., et al., *Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans*. Bone, 2003. **32**(3): p. 284-290.
 136. Chappard, C., et al., *Subchondral bone micro-architectural alterations in osteoarthritis: a synchrotron micro-computed tomography study*. Osteoarthritis and cartilage, 2006. **14**(3): p. 215-223.
 137. Finnilä, M.A., et al., *Association between subchondral bone structure and osteoarthritis histopathological grade*. Journal of Orthopaedic Research, 2016.
 138. Li, Z.C., et al., *Difference in subchondral cancellous bone between postmenopausal women with hip osteoarthritis and osteoporotic fracture: implication for fatigue*

- microdamage, bone microarchitecture, and biomechanical properties*. Arthritis & Rheumatism, 2012. **64**(12): p. 3955-3962.
139. Mittra, E., C. Rubin, and Y.-X. Qin, *Interrelationship of trabecular mechanical and microstructural properties in sheep trabecular bone*. Journal of biomechanics, 2005. **38**(6): p. 1229-1237.
 140. Zhen, G., et al., *Inhibition of TGF- β signaling in subchondral bone mesenchymal stem cells attenuates osteoarthritis*. Nature medicine, 2013. **19**(6): p. 704.
 141. Botter, S., et al., *Cartilage damage pattern in relation to subchondral plate thickness in a collagenase-induced model of osteoarthritis*. Osteoarthritis and cartilage, 2008. **16**(4): p. 506-514.
 142. Botter, S.M., et al., *Osteoarthritis induction leads to early and temporal subchondral plate porosity in the tibial plateau of mice: an in vivo microfocal computed tomography study*. Arthritis & Rheumatism, 2011. **63**(9): p. 2690-2699.
 143. Hwang, J., et al., *Increased hydraulic conductance of human articular cartilage and subchondral bone plate with progression of osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2008. **58**(12): p. 3831-3842.
 144. Zhen, G., et al., *Inhibition of TGF-[beta] signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis*. Nature medicine, 2013. **19**(6): p. 704-712.
 145. Simkin, P.A., *Consider the tidemark*. 2012, The Journal of Rheumatology.
 146. Kamibayashi, L., et al., *Trabecular microstructure in the medial condyle of the proximal tibia of patients with knee osteoarthritis*. Bone, 1995. **17**(1): p. 27-35.
 147. Fazzalari, N. and I. Parkinson, *Fractal properties of subchondral cancellous bone in severe osteoarthritis of the hip*. Journal of Bone and Mineral Research, 1997. **12**(4): p. 632-640.
 148. Burr, D.B., *The importance of subchondral bone in osteoarthritis*. Current opinion in rheumatology, 1998. **10**(3): p. 256-262.
 149. Radin, E.L. and R.M. Rose, *Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage*. Clinical orthopaedics and related research, 1986. **213**: p. 34-40.
 150. Funck-Brentano, T. and M. Cohen-Solal, *Subchondral bone and osteoarthritis*. Current opinion in rheumatology, 2015. **27**(4): p. 420-426.
 151. Messent, E., et al., *Osteophytes, juxta-articular radiolucencies and cancellous bone changes in the proximal tibia of patients with knee osteoarthritis*. Osteoarthritis and cartilage, 2007. **15**(2): p. 179-186.
 152. Li, B. and R.M. Aspden, *Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 1997. **56**(4): p. 247-254.
 153. Day, J., et al., *A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritic cartilage damage*. Journal of orthopaedic research, 2001. **19**(5): p. 914-918.
 154. Sniekers, Y.H., et al., *A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models*. BMC musculoskeletal disorders, 2008. **9**(1): p. 20.
 155. Lafeber, F., et al., *Human osteoarthritic cartilage is synthetically more active but in culture less vital than normal cartilage*. The Journal of rheumatology, 1992. **19**(1): p. 123-129.
 156. Westacott, C.I., et al., *Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone*. Arthritis & Rheumatology, 1997. **40**(7): p. 1282-1291.
 157. Bonnet, C. and D. Walsh, *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation*. Rheumatology, 2005. **44**(1): p. 7-16.

158. Nico, B., et al., *Nerve growth factor as an angiogenic factor*. Microvascular research, 2008. **75**(2): p. 135-141.
159. Warner, S.C., et al., *Pain in knee osteoarthritis is associated with variation in the neurokinin 1/substance P receptor (TACR1) gene*. European Journal of Pain, 2017. **21**(7): p. 1277-1284.
160. Arnoldi, C.C., et al., *Intraosseous hypertension and pain in the knee*. Bone & Joint Journal, 1975. **57**(3): p. 360-363.
161. Sanchez, C., et al., *Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6,-1 β and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts*. Osteoarthritis and cartilage, 2005. **13**(11): p. 979-987.

Masnsen CHERIEF

Comprendre l'Arthrose: Analyse histomorphométrique de l'unité os-cartilage

Résumé :

L'importance de l'os sous-chondral dans la pathogenèse et la prise en charge de l'arthrose intéresse les cliniciens et la communauté scientifique. En effet, il existe des liens forts entre l'os sous-chondral et le cartilage, maintenant l'intégrité de ce dernier reposant sur l'os sous-chondral pour fournir un support mécanique et un soutien nutritionnel. Ici, nous avons étudié la relation entre les structures osseuses et cartilagineuses et l'approvisionnement vasculaire dans l'arthrose de la humaine.

Nous avons recueilli 37 plateaux tibiaux arthrosiques prélevés après arthroplastie totale du genou. Dans ces mêmes plateaux, plusieurs carottes ont été prélevées et scannées par microtomographie. Les projections résultantes ont été reconstruites, puis segmentées manuellement pour séparer l'os sous-chondral de l'os trabéculaire et une analyse microarchitecturale a été développée sous les deux structures osseuses. Les échantillons ont été décalcifiés, coupés en sections de 16 heures, colorés dans de l'HES et classés en 6 groupes selon l'échelle OARSI. La surface de l'os sous-chondral et l'épaisseur et la surface du cartilage articulaire ont été cultivées. Le nombre de vaisseaux dans le sous-chondral a été compté par deux opérateurs différents et une coloration immunofluorescente avec du VEGF a été effectuée. Enfin, le cartilage, l'os sous-chondral et trabéculaire ont été utilisés pour mesurer les marqueurs ribonucléiques et protéiques liés à la vascularisation, l'innervation et l'inflammation.

La microstructure de l'os a évolué au fur et à mesure que l'arthrose s'aggrave. L'os sous-chondral s'est épaissi et est devenu plus poreux. La fraction volumique osseuse, l'épaisseur trabéculaire, l'espacement et le nombre de trabécules ont été corrélés positivement avec le score OARSI. Une diminution significative du nombre de vaisseaux sanguins a été observée au dernier stade de l'arthrose. Enfin, les marqueurs ribonucléiques et protéiques liés à la vascularisation, à l'innervation et à l'inflammation ont été modulés au cours du développement de la pathologie. Pris ensemble, nos données montrent une interaction et des structures de soutien dynamiques entre l'os sous-chondral et le cartilage. La compréhension des voies de signalisation, l'unité biochimique du cartilage dans les articulations et la communication intercellulaire entre le cartilage et l'os sous-chondral peuvent mener à l'élaboration de stratégies plus efficaces pour traiter les patients souffrant d'arthrose. .

Mots clés : arthrose, os sous-chondral, microarchitecture, vascularisation

Understanding Arthritis: histomorphometric analysis of the bone-cartilage unit

Summary:

The importance of subchondral bone in the pathogenesis and management of osteoarthritis retain the interest of clinicians and the scientific community. Indeed, there are strong links between the subchondral bone and the cartilage, maintaining the integrity of the latter resting on the subchondral bone to provide mechanical and nutritional support. Here, we investigated the relationship between bone and cartilage structures and vascular supply in human osteoarthritis.

We collected 37 osteoarthritic tibial plates taken after total knee arthroplasty. In these same plates, several carrots were removed and scanned by microtomography. The resulting projections were reconstructed, then manually segmented to separate the subchondral bone from the trabecular bone and a microarchitectural analysis was done on both bone structures. The samples were decalcified, cut into 4 μ m sections, stained in HES and classified into 6 groups according to the OARSI scale. The surface of the subchondral bone and the thickness and surface of the articular cartilage were measured. The number of vessels in the subchondral region was counted by two different operators and a VEGF immunofluorescent staining was performed. Finally, cartilage, subchondral and trabecular bone were used to measure ribonucleic and protein markers related to vascularization, innervation and inflammation.

The microstructure of the bone has evolved as osteoarthritis worsens. The subchondral bone has thickened and become more porous. Bone volume fraction, trabecular thickness, spacing and number of trabeculae were positively correlated with the OARSI score. A significant decrease in the number of blood vessels was observed in the last stage of osteoarthritis. Finally, ribonucleic and protein markers related to vascularization, innervation and inflammation were modulated during the development of the pathology. Taken together, our data show dynamic interaction and support structures between subchondral bone and cartilage. Understanding of signaling pathways, the biochemical unity of cartilage in the joints and intercellular communication between cartilage and subchondral bone can lead to the development of more effective strategies for treating patients with osteoarthritis.

Keywords: osteoarthritis, subchondral bone, microarchitecture, vascularization

Communication et publications

Toumi H, Hambli R, Best TM, **Cherief M**, Mazor M, Lerguech G, Jennane R, Lespessailles E. Calf Muscle Contributions to Achilles Tendon Architectures And Injuries Using Finite Element modeling : 2875 Board#7 June 3, 1/00PM – 3 :00 PM. Med Sci Sports Exerc. Mai 2016 ; 48(5S Suppl 1) : 804.

Aveline P, Lespessailles E, Mazor M, Lerguech G, **Cherief M**, Best TM, Toumi H. Physical Exercise Programs In A Young Female Rat Model : What Is Most Osteogenic ? : 1799 Board #1 June 2, 1 :00 PM – 3 :00 PM. Med Sci Sports Exerc. Mai 2016 ;48(5S Suppl 1):490.

Toumi H, Lerguech G, **Cherief M**, Batakis A, Hambli R, Jennane R, Best T, Lespessailles E. Implications of the calf musculature and Achilles tendon architecture for understanding the site of injuries. Journal of Biomechanics. Submitted the 7th may 2015. Accepted in February 2016. Published in March 2016.

List of communication: (Some publications were also subject to communications)

Toumi H, Hambli R, Best TM, **Cherief M**, Mazor M, Lerguech G, Jennane R, Lespessailles E. Calf Muscle Contributions to Achilles Tendon Architectures And Injuries Using Finite Element modeling : 2875 Board#7 June 3, 1/00PM – 3 :00 PM. ACSM 2016. Boston

Aveline P, Lespessailles E, Mazor M, Lerguech G, **Cherief M**, Best TM, Toumi H. Physical Exercise Programs In A Young Female Rat Model : What Is Most Osteogenic ? : 1799 Board #1 June 2, 1 :00 PM – 3 :00 PM. ACSM 2016. Boston

Mazor M, **Cherief M**, Lerguech G, Coursier R, Best T, Lespessailles E, Toumi H .A Potential Breakthrough in Osteoarthritis Treatment : Alternative Method for Cartilage Repair By Mesenchymal Stem Cells : 1362 Board# 155 May 28, 9 :00 AM-10 :30 AM. Medicine & Science in Sports & Exercise 47 (5S), 363.

Cherief M, Lerguech G, Mazor M, Coursier R, Best TM, Lespessailles E, Toumi H. Is Subchondral Bone Plate Innervation and Vascularisation Associated with Knee Oa . 2124 Board#2 May 28,2015, 5 :45 PM-6 :45 PM. Medicine & Science in Sports & Exercise 47 (5S),570.

Cherief M, Larguech G, Mazor M, Coursier R, Best TM, Lespessailles E, Toumi H. Is Subchondral Bone Plate Innervation and Vascularisation Associated with Knee Oa .2427 Board# 174, May 29, 2015, 9 :30 AM-11 :00 AM. Medicine & Science in Sports & Exercise 47 (5S),655.

Toumi H, Larguech G, **Cherief M**, Mazor M, Best TM, Jennane R, Hambli R. Association Between Individual Calf Muscle Volume and Achilles Tendon enthesis Morphology : 375 Board#226, May 27,2015, 11 :00 AM- 12 :30PM. Medicine & Science in Sports & Exercise 47 (5S),96.

Aveline P, Lespessailles E, Mazor M, **Cherief M**, Larguech G, Best TM, Toumi H. Does Exercise Have an Additional effect To Strontium Ranelate On Bone Status. 2781 Board# 96, May 29, 2015. 2 :00 PM- 3 :30PM. Medicine & Science in Sports & Exercise 47 (5S),754.

Posters:

Toumi H, Best TM, **Cherief M**, Larguech G, Mazor M, Lespessailles E. Increasing Body Weight Alters Lower Limb Muscle Balance And Foot Control. May 2017. ACSM Denver, Colorado.

Cherief M, Cesaro A, Best TM, Ali M, Lespessailles E, Toumi H. Cartilage And Subchondral Bone Histomorphometry In Osteoarthritis Knee. May 2017, ACSM Denver, Colorado.

Toumi H, Larguech G, **Cherief M**, best TM, Jennane R, Hambli R, Lespessailles E. Association between Individual Calf Muscle Volume and Achilles Tendon Entthesis Morphology. May 2015. ACSM San Diego, California.

Cherief M, Larguech G, Mazor M, Best TM, Lespessailles E, Toumi H. Is Subchondral Bone Plate Innervation And Vascularisation Associated With Knee Oa. May 2015. ACSM San Diego, California.

Aveline P, Lespessailles E, **Cherief M**, Mazor M, Larguech G, Best TM, Toumi H. Does Exercise Have an Additional Effect To Strontium Ranelate On Bone Status ? May 2015. ACSM San Diego, California.

Cherief M, Mazor M, Larguech G, Lespessailles E, Toumi H. Vascularisation et innervation dans l'arthrose du genou. Colloque Biotechnocentre, Seillac, France, 9 & 10 octobre 2014.

Mazor M, Larguech G, Coursier R, **Cherief M**, Lespessailles E, Toumi H. A breakthrough in the treatment of Osteoarthritis : Alternative method for cartilage repair by mesenchymal stem cells from osteoarthritic area. Colloque Biotechnocentre, Seillac, France, 9 & 10 octobre 2014.

Larguech G, **Cherief M**, Toumi H, Lespessailles E, Daniellou R. Effect of β - 1,3 and β - 1,6 – D- Glucan on Chondrogenic Differentiation. Colloque Biotechnocentre, Seillac, France, 9 & 10 octobre 2014.

Mazor M.,Larguech G., Coursier R., **Cherief M.**, Lespessailles E., Toumi H. A breakthrough in the treatment of Osteoarthritis: Alternative method for cartilage repair by mesenchymal stem cells from osteoarthritic area. 2014. Colloque Biotechnocentre.

Cherief M, Mazor M, Larguech G, Lespessailles E, Toumi H. Douleur et arthrose : mythe ou réalité. 2014. Colloque Biotechnocentre.

Larguech G, **Cherief M**, Toumi H, Lespessailles E, Daniellou R.Effect of Beta 1.3/1.6 Glucan on chondrogenic differentiation. 2014. Colloque Biotechnocentre.

Toumi H, Larguech G, **Cherief M**, Best TM, Jenanne R, Hambli R, Lespessailles E. Association between individual calf muscle volume and Achilles tendon enthesis morphology. November 2014. ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise, Florida.

Mazor M, **Cherief M**, Laguech G, Best TM, Lespessailles E, Toumi H. A potential breakthrough in osteoarthritis treatment: Alternative method for cartilage repair by mesenchymal stem cells. November 2014. ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise, Florida.

Aveline P, Lespessailles E, **Cherief M**, Mazor M, Laguech G, Best TM, Toumi H. Does exercise has an additive effect to Strontium Ranelate on bone status? November 2014. ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise, Florida.

Cherief M, Laguech G, Mazor M, Best TM, Lespessailles E, Toumi H. Is Subchondral Bone Plate Innervation And Vascularisation Associated With Knee. November 2014. ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise, Florida.