# VETAGRO SUP
## CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2015 - Thèse n°

***ELABORATION ET ESSAIS PRELIMINAIRES D'UN PROTOCOLE EXPERIMENTAL IN VITRO PERMETTANT D'EVALUER L'INFLUENCE DE LIQUIDES SYNOVIAUX ISSUS D'ARTICULATIONS ARTHROSIQUES DE CHEVAL SUR LES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES***

# THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 18 septembre 2015
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*Dubois Elodie*
Née le 26 juin 1989
à Aubenas (07)

# LISTE DES ENSEIGNANTS DU CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

*Mise à jour le 09 juin 2015*

| Civilité | Nom | Prénom | Unités pédagogiques | Grade |
|---|---|---|---|---|
| M. | ALOGNINOUWA | Théodore | Unité pédagogique Pathologie du bétail | Professeur |
| M. | ALVES-DE-OLIVEIRA | Laurent | Unité pédagogique Gestion des élevages | Maître de conférences |
| Mme | ARCANGIOLI | Marie-Anne | Unité pédagogique Pathologie du bétail | Maître de conférences |
| M. | ARTOIS | Marc | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |
| M. | BARTHELEMY | Anthony | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences Contractuel |
| Mme | BECKER | Claire | Unité pédagogique Pathologie du bétail | Maître de conférences |
| Mme | BELLUCO | Sara | Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie | Maître de conférences |
| Mme | BENAMOU-SMITH | Agnès | Unité pédagogique Equine | Maître de conférences |
| M. | BENOIT | Etienne | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Professeur |
| M. | BERNY | Philippe | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Professeur |
| Mme | BERTHELET | Marie-Anne | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences |
| Mme | BONNET-GARIN | Jeanne-Marie | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Professeur |
| Mme | BOULOCHER | Caroline | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences |
| M. | BOURDOISEAU | Gilles | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |
| M. | BOURGOIN | Gilles | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences |
| M. | BRUYERE | Pierre | Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de la reproduction | Maître de conférences |
| M. | BUFF | Samuel | Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de la reproduction | Maître de conférences |
| M. | BURONFOSSE | Thierry | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Professeur |
| M. | CACHON | Thibaut | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences |
| M. | CADORE | Jean-Luc | Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie | Professeur |
| Mme | CALLAIT-CARDINAL | Marie-Pierre | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences |
| M. | CAROZZO | Claude | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences |
| M. | CHABANNE | Luc | Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie | Professeur |
| Mme | CHALVET-MONFRAY | Karine | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Professeur |
| M. | COMMUN | Loic | Unité pédagogique Gestion des élevages | Maître de conférences |
| Mme | DE BOYER DES ROCHES | Alice | Unité pédagogique Gestion des élevages | Maître de conférences |
| Mme | DELIGNETTE-MULLER | Marie-Laure | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Professeur |
| M. | DEMONT | Pierre | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |
| Mme | DESJARDINS PESSON | Isabelle | Unité pédagogique Equine | Maître de conférences Contractuel |
| Mme | DJELOUADJI | Zorée | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences |
| Mme | ESCRIOU | Catherine | Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie | Maître de conférences |
| M. | FAU | Didier | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Professeur |
| Mme | FOURNEL | Corinne | Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie | Professeur |
| M. | FREYBURGER | Ludovic | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences |
| M. | FRIKHA | Mohamed-Ridha | Unité pédagogique Pathologie du bétail | Maître de conférences |
| Mme | GILOT-FROMONT | Emmanuelle | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |
| M. | GONTHIER | Alain | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences |
| Mme | GRAIN | Françoise | Unité pédagogique Gestion des élevages | Professeur |
| M. | GRANCHER | Denis | Unité pédagogique Gestion des élevages | Maître de conférences |
| Mme | GREZEL | Delphine | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences |
| M. | GUERIN | Pierre | Unité pédagogique Biotechnologies et pathologie de la reproduction | Professeur |
| Mme | HUGONNARD | Marine | Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie | Maître de conférences |
| M. | JUNOT | Stéphane | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences |
| M. | KECK | Gérard | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Professeur |
| M. | KODJO | Angeli | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |
| Mme | LAABERKI | Maria-Halima | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences |
| M. | LACHERETZ | Antoine | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |
| Mme | LAMBERT | Véronique | Unité pédagogique Gestion des élevages | Maître de conférences |
| Mme | LATTARD | Virginie | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Maître de conférences |
| Mme | LE GRAND | Dominique | Unité pédagogique Pathologie du bétail | Professeur |
| Mme | LEBLOND | Agnès | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |
| Mme | LEFRANC-POHL | Anne-Cécile | Unité pédagogique Equine | Maître de conférences |
| M. | LEPAGE | Olivier | Unité pédagogique Equine | Professeur |
| Mme | LOUZIER | Vanessa | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Maître de conférences |
| M. | MARCHAL | Thierry | Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie | Professeur |
| M. | MOUNIER | Luc | Unité pédagogique Gestion des élevages | Maître de conférences |
| M. | PEPIN | Michel | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |
| M. | PIN | Didier | Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie | Maître de conférences |
| Mme | PONCE | Frédérique | Unité pédagogique Pathologie médicale des animaux de compagnie | Maître de conférences |
| Mme | PORTIER | Karine | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences |
| Mme | POUZOT-NEVORET | Céline | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences |
| Mme | PROUILLAC | Caroline | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Maître de conférences |
| Mme | REMY | Denise | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Professeur |
| Mme | RENE MARTELLET | Magalie | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences stagiaire |
| M. | ROGER | Thierry | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Professeur |
| M. | SABATIER | Philippe | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Professeur |
| M. | SAWAYA | Serge | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences |
| M. | SCHRAMME | Serge | Unité pédagogique Equine | Professeur associé |
| Mme | SEGARD | Emilie | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences Contractuel |
| Mme | SERGENTET | Delphine | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Maître de conférences |
| Mme | SONET | Juliette | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Maître de conférences Contractuel |
| M. | THIEBAULT | Jean-Jacques | Unité pédagogique Biologie fonctionnelle | Maître de conférences |
| M. | TORTEREAU | Antonin | Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie | Maître de conférences stagiaire |
| M. | VIGUIER | Eric | Unité pédagogique Anatomie Chirurgie (ACSAI) | Professeur |
| Mme | VIRIEUX-WATRELOT | Dorothée | Unité pédagogique Pathologie morphologique et clinique des animaux de compagnie | Maître de conférences Contractuel |
| M. | ZENNER | Lionel | Unité pédagogique Santé Publique et Vétérinaire | Professeur |

# *Remerciements*

**A Monsieur le Professeur Roland Chapurlat**

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider notre jury de thèse,

Sincères remerciements pour sa gentillesse et sa réactivité

Tous mes hommages les plus respectueux

**Au Docteur Caroline Boulocher**

Pour toutes ses qualités scientifiques et humaines qui en font une personne qu'on n'oublie jamais

Des remerciements infinis pour son inestimable bienveillance et son énergie irremplaçable

Avec l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect

**A Monsieur le Professeur Olivier Lepage**

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de siéger à ce jury

Pour sa rigueur et sa volonté de nous transmettre ses innombrables savoirs

Pour nous initier aux dimensions humaine et philosophique de notre métier

Avec l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect

# *Remerciements*

**Au Docteur Nathalie Saulnier**
Qui a rendu ce projet possible
Pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa rigueur scientifique
Pour tout ce qu'elle a eu l'immense patience de m'enseigner
Avec l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect

**Au Docteur Stéphane Maddens**
Qui a rendu ce projet possible
Pour son charisme, son dynamisme, sa passion communicative
Pour toute la confiance qu'il a su m'accorder
Avec l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect

**A Monsieur le Professeur Michael Schramme**
Pour son aide précieuse dans la réalisation de ce projet
Pour sa gentillesse et son humanité
Pour sa passion de son métier et son immense savoir qu'il réussit à nous transmettre
Avec l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect

**Au Docteur Elodie Pillet**
Pour son aide précieuse dans la réalisation de ce projet
Pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour son infini et authentique gentillesse
Pour son incroyable patience à m'aider, m'expliquer, m'apprendre
Avec tous mes remerciements sincères et profonds

**A Ophélie Pollet**
Pour sa relecture attentive de ce manuscrit
Pour les conseils précieux qu'elle a su m'accorder
Avec l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect

**A Clément Robert, Marine Febre et Julia**
Pour votre aide si précieuse et indispensable dans la réalisation de ce projet
Pour vos conseils toujours avisés, votre bienveillance, votre inestimable patience
Je ne vous remercierai jamais assez, mais ce sera une fois de plus

*A mes parents*

*A qui je dédie cette thèse*

*Enfin*

*Pour ce que je suis devenue*

*Parce que je n'aurais pas voulu que cela soit autrement*

*Merci*

# *Sommaire*

*Table des annexes* ..... *16*

*Table des figures* ..... *17*

*Table des tableaux* ..... *19*

*Table des abréviations* ..... *20*

*Introduction* ..... *21*

***PARTIE I : étude bibliographique* ..... *22***

**I. L'organe diarthrosique ..... 22**

A. Le cartilage articulaire : structure centrale de la diarthrose ..... 23

1. Organisation du cartilage articulaire ..... 24

2. Composition du cartilage articulaire ..... 26

a. Les chondrocytes, unique type cellulaire du cartilage (Archer, 2003) (Frisbie D. , 2012) ..... 26

b. Les protéoglycanes (Fox, 2009) (Frisbie D. , 2012) (Roughley, 2006) ..... 27

c. Les fibres de collagène ..... 29

3. Fonctions du cartilage (Archer, 2003) (Frisbie D. , 2012) ..... 30

B. Les structures osseuses de l'organe articulaire ..... 32

C. La membrane synoviale ..... 34

1. Composition du synovium ..... 34

2. Les indispensables fonctions de la membrane synoviale (Scanzello, 2012) (Tiwari, 2010) ..... 35

D. Le liquide synovial sain ..... 36

1. Un dialysat sanguin modifié ..... 36

2. Nutrition et lubrification articulaire ..... 37

E. La capsule articulaire et les ligaments (Frandson, 2003) (Auer, 2012) (Barone, 2000) ..... 38

1. La capsule articulaire ..... 38

2. Les ligaments ..... 39

3. Participation à la stabilité articulaire ..... 39

F. Vascularisation de l'organe diarthrosique (Remy, 2012) (Barone, 2000) ..... 39

G. Innervation de l'articulation synoviale (Trotter, 1996) (Barone, 2000) (Takeba, 2001) ..... 40

H. L'homéostasie au sein des diarthroses ..... 41

1. Voie des métalloprotéinases (Boire, 2012) (Hurlbeck, 2014) ..... 41

2. L'équilibre des cytokines (Demay, 2004) (Boire, 2012) (Fayolle, 2007) ..... 42

**II. L'ostéoarthrose, une maladie de l'organe diarthrose : rôle pathophysiologique complexe de l'inflammation ..... 44**

A. Facteurs de risque chez les équidés ..... 45
1. L'âge ..... 45
2. Le sexe ..... 45
3. La race ..... 46
4. Traumatisme et stress mécanique (Lejeune, 2006) ..... 47
5. Le poids ..... 47
6. L'alimentation (Lejeune, 2006) ..... 47
B. Physiopathologie de l'ostéoarthrose ..... 48
1. Théorie mécanique ..... 48
2. Théorie cellulaire ..... 48
3. Effet « domino » de la cascade inflammatoire ..... 49
C. Le coût de l'ostéoarthrose ..... 50
1. Un fardeau socio-économique ..... 50
2. Expression clinique et moyens diagnostics chez le cheval ..... 52
a. Une clinique incertaine et un diagnostic tardif ..... 52
b. La radiographie et ses imperfections ..... 52
c. La scintigraphie ..... 53
d. La performance de l'imagerie par résonance magnétique ..... 54
e. L'échographie complémentaire ..... 54
f. L'avenir dans le liquide synovial ? ..... 55

**III. Options de traitements de l'ostéoarthrose chez le cheval ..... 56**

A. Traitement médical ..... 56
1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Goodrich, 2006) (Robinson, 2009) (Viel, 2006) ..... 56
2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens par voie intra-articulaire ..... 58
3. L'acide hyaluronique (Robinson, 2009) (Goodrich, 2006) ..... 60
4. Glycosaminoglycanes polysulfatés (PSGAGs) ..... 62
5. Glucosamine et chondroïtine sulfate par voie orale (Goodrich, 2006) ..... 62
6. Le tiludronate par voie intraveineuse ..... 63
B. Traitement chirurgical ..... 64
C. Technologies médicales ..... 65
1. Les ondes de choc ..... 65
2. Protéine antagoniste du récepteur à l'interleukine 1 (IRAP ou IL1Ra) ..... 66
3. Le concentré plaquettaire ou PRP ..... 67
4. Vers une médecine personnalisée ? ..... 69

**IV. Les cellules stromales mésenchymateuses et leurs applications en médecine vétérinaire équine 71**

A. Définitions et terminologie ..... 71

B. L'importance de la niche des CSM ..... 72
C. Autres propriétés ..... 74
1. Prolifération et différenciation ..... 74
2. Plasticité des cellules stromales ..... 75
3. Effets autocrines et paracrines ..... 76
4. Immunomodulation ..... 76
D. Les sources de cellules stromales chez le cheval ..... 77
E. Les utilisations actuelles chez le cheval ..... 79
1. Tendinite et desmite ligamentaire ..... 79
2. Fourbure ..... 80
F. Ostéoarthrose et cellules stromales mésenchymateuses ..... 81
1. Potentiels d'action ..... 81
2. Protocole thérapeutique ..... 84
G. Effets secondaires potentiels ..... 85
1. Transmission de pathogènes ..... 85
2. Transformation maligne ..... 85
3. Formations ectopiques ..... 85
4. Immunogénicité ..... 85

***PARTIE II : étude expérimentale ..... 87***

**I. Matériel, méthodes et études préliminaires ..... 87**

A. Matériel biologique ..... 87
1. CSM ..... 87
2. Banque de liquides synoviaux pathologiques ..... 88
a. Prélèvement ..... 88
b. Analyses préliminaires ..... 88
c. Conservation des liquides synoviaux ..... 89
d. Synthèse de la banque de liquides synoviaux pathologiques ..... 89
e. L'ostéochondrose ..... 92
f. Conclusion ..... 94
3. Banque de liquides synoviaux sains ..... 94
a. Choix des chevaux prélevés ..... 94
b. Protocole de prélèvement ..... 95
c. Analyses liminaires ..... 96
d. Conservation ..... 96
B. Etudes préliminaires ..... 96
1. Objectifs ..... 96
2. Prérequis ..... 96

a. L'iodure de propidium (IP) ..... 97
b. Le cytomètre en flux – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) (Cambournac, 2012) ..... 97
c. Caractérisation phénotypique des CSM – le CMH-II ..... 98
3. Cellules stromales mésenchymateuses en suspension ..... 99
4. Cellules stromales mésenchymateuses en adhérence ..... 104
5. Bilan des manipulations préliminaires ..... 107
C. Etude cinétique ..... 107
1. Prérequis ..... 107
a. La PCR quantitative ..... 107
b. Les gènes de ménage ..... 108
2. Choix des molécules et élaboration des amorces ..... 109
3. Etude cinétique : première partie ..... 109
a. Matériel ..... 109
b. Méthode ..... 110
4. Réalisation de la PCR quantitative ..... 111
a. Extraction d'ARN ..... 111
b. Dosage de l'ARN par spectrophotométrie ..... 111
c. Synthèse des ADNc ..... 113
d. Test des amorces ..... 113
e. Résultats ..... 114
5. Etude cinétique : manipulations complémentaires ..... 115
a. Objectifs ..... 115
b. Matériel ..... 115
c. Méthode ..... 116
d. Tentative d'explication de la mortalité des CSM ..... 117
e. Bilan ..... 117
D. Caractérisation du profil inflammatoire des LS ..... 117
1. Composition cellulaire ..... 117
a. Technique utilisée ..... 117
b. Résultats ..... 118
c. Bilan ..... 118
2. Concentration en TNF-α ..... 118
a. Principe du dosage ..... 118
b. Matériel ..... 119
c. Méthode ..... 120
d. Résultats ..... 122
e. Discussion ..... 124
f. Bilan du dosage de TNFα ..... 125

**II. Résultat : élaboration d'un protocole permettant de mesurer *in vitro* l'influence de la qualité du liquide synovial sur l'activité des cellules stromales mésenchymateuses .....125**

A. Les CSM ..... 125

B. Le LS ..... 126

1. Choix des chevaux ..... 126
2. Prélèvement et conservation ..... 126
3. Analyses immédiates sur place ..... 127
4. Composition cellulaire ..... 127
5. Caractérisation du profil inflammatoire : concentration en TNF-α ..... 128
   a. Matériel ..... 128
   b. Méthode ..... 129

C. Mesure de l'influence de la qualité du liquide synovial sur l'activité des CSM ..... 136

1. Première phase en suspension ..... 136
   a. Matériel : ..... 136
   b. Méthode ..... 138
2. 2ème phase en adhérence ..... 143
3. Réalisation de la PCR quantitative ..... 144
   a. Choix des molécules cibles ..... 144
   b. Elaboration des amorces ..... 144
   c. Extraction d'ARN ..... 144
   d. Dosage d'ARN par spectrophotométrie ..... 146
   e. Synthèse des ADNc ..... 146
   f. Test des amorces ..... 147
   g. PCR quantitative ..... 148

D. Conclusion ..... 148

***Bibliographie* .....151**

***Annexes*.....166**

## Table des annexes

*Annexe 1 : LS pathologiques - récapitulatif des informations concernant les animaux prélevés et résultats des analyses initiales* ..... *166*

*Annexe 2 : LS sains - récapitulatif des informations concernant les animaux prélevés et résultats des analyses initiales* ..... *173*

*Annexe 3 : résumé des informations concernant les gènes cibles et les amorces correspondantes utilisées lors de l'étude cinétique* ..... *175*

*Annexe 4 : méthode d'extraction d'ARN, descriptif pour un tube – kit Perfect Pure RNA Cell & Tissue de Prime 5* ..... *176*

*Annexe 5 : tampons nécessaires à l'utilisation du kit Equine TNFα ELISA de Thermo Scientific* ..... *177*

*Annexe 6 : principe d'utilisation d'une cellule de Malassez* ..... *178*

## Table des figures

*Figure 1 : schéma d'une diarthrose (McIlwraith, 2001) ..... 22*
*Figure 2 : vue plantaire d'une épiphyse fémorale de cheval révélant les condyles fémoraux latéral (LFC) et médial (MFC) (Cluzel, 2013) ..... 23*
*Figure 3 : cartilage articulaire sain observé au microscope électronique (Desrochers, 2013) ..... 23*
*Figure 4 : structure du cartilage articulaire sain chez l'adulte (Poole, 2001) ..... 25*
*Figure 5 : composition relative du cartilage articulaire d'après Oei, 2014 ..... 26*
*Figure 6 : schéma d'un protéoglycane (Roughley, 2006) ..... 28*
*Figure 7 : structure de la matrice cartilagineuse (Poole, 2001) ..... 28*
*Figure 8 : organisation des fibres de collagène au sein du cartilage articulaire (Fox, 2009) ..... 29*
*Figure 9 : organisation des fibres de collagène et histologie du cartilage articulaire (Gross, 2009) ..... 30*
*Figure 10 : elasticité du cartilage et mode de nutrition (Auer, 2012) ..... 31*
*Figure 11 : position de l'os sous-chondrale (coloration safranine O et fast green) (Roemhildt, 2012) ..... 32*
*Figure 12 : structure de l'os sous-chondral dans une articulation humaine saine (Li, 2013) ..... 32*
*Figure 13 : description schématique des structures des deux couches du synovium (Tiwari, 2010) ..... 34*
*Figure 14 : schéma du rôle des différentes enzymes dans l'homéostasie articulaire [d'après (Fayolle, 2007)] .... 42*
*Figure 15 : schéma du rôle des différentes interleukines dans l'homéostasie articulaire [d'après (Boire, 2012)] 43*
*Figure 16 : résumé des facteurs intra-/extra-articulaires prédisposant à la mise en place d'ostéoarthrose (Riggs, 2006) ..... 44*
*Figure 17 : résumé de la physiopathogénie de l'arthrose [d'après (Boire, 2012) (Demoor, 2014) (Fayolle, 2007)] ..... 50*
*Figure 18 : le fardeau de l'ostéoarthrose [d'après (Hunter, 2014)] ..... 51*
*Figure 19 : radiographie d'une articulation coxo-fémorale de chien saine (Bellocq, 2007) ..... 53*
*Figure 20 : radiographie d'une articulation coxo-fémorale de chien arthrosique (Bellocq, 2007) ..... 53*
*Figure 21 : exemple de comparaison d'images sinctigraphique, radiographique et d'IRM (Daniel, 2012) ..... 54*
*Figure 22 : échographie Doppler du genou d'une femme de 71 ans souffrant d'ostéoarthrose, objectivation d'une synovite (Wick, 2014) ..... 55*
*Figure 23 : la cascade de l'inflammation (McIlwraith C. T., 1996) ..... 57*
*Figure 24 : rappel de l'impact de la rupture du cycle de l'inflammation par action sur l'IL-1 [d'après (McIlwraith, 2010)] ..... 66*
*Figure 25 : rôle des facteurs de croissance produits par les plaquettes et concentration moyenne dans le PRP chez l'Homme (Wroblewski, 2010) ..... 68*
*Figure 26 : classification des différents types de cellules stromales (Bourzac, 2009) ..... 72*
*Figure 27 : illustration des capacités de différentiation des cellules stromales mésenchymateuses (Caplan, 2007) ..... 74*
*Figure 28 : exemple de transdifférenciation d'après Herzog (2003) ..... 75*
*Figure 29 : exemple de fusion d'après Herzog (2003) ..... 75*

*Figure 30 : les effets immunomodulateurs des CSMs (Nauta, 2007)* ..... *77*
*Figure 31 : les deux sources de CSM équines les plus couramment utilisées et leurs produits dérivés (Schnabel, 2013)* ..... *78*
*Figure 32 : changements pathologiques dans l'ostéoarthrose équine (Frisbie D. S., 2011)* ..... *82*
*Figure 33 : étiologie proposée de l'ostéochondrose menant à l'OCD ou aux lésions kystiques sous-chondrales (d'après McIlwraith, 2011)* ..... *93*
*Figure 34 : exemple de cytogramme obtenu par cytométrie en flux lors d'une étude de la mort cellulaire (Larbret, 2011)* ..... *98*
*Figure 35 : plan de plaque pour l'étude préliminaire des CSM en suspension* ..... *101*
*Figure 36 : plan de plaque pour l'étude préliminaire des CSM en adhérence* ..... *105*
*Figure 37 : plan de plaque de la première partie de l'étude cinétique* ..... *110*
*Figure 38 : représentation schématique de la transmission lumineuse (d'après Somma, 2006)* ..... *111*
*Figure 39 : plan de plaque des manipulations complémentaires de l'étude cinétique* ..... *116*
*Figure 40 : schéma de la technique ELISA sandwich utilisée pour le dosage du TNFα dans les LS (schéma personnel)* ..... *119*
*Figure 41 : plan de plaque pour le dosage du TNFα* ..... *121*

## Table des tableaux

*Tableau I : caractéristiques du liquide synovial normal d'après Marchat, 2010* ..... *36*

*Tableau II : posologie et temps de détection des AINS chez le cheval [D'après (Fédération Equestre Internationale, 2013)]* ..... *58*

*Tableau III : concentration, dose recommandée, temps de détection et informations générales sur les 3 principaux corticostéroïdes couramment utilisés par voie intra-articulaire chez le cheval [d'après (Caron J. , 2005) & (Goodrich, 2006) & (Fédération Equestre Internationale, 2013)]* ..... *60*

*Tableau IV : protocoles de base dans le traitement de l'ostéoarthrose pour différentes articulations du cheval (Weinberger, 2008)* ..... *67*

*Tableau V : les objectifs de la médecine personnalisée [d'après (Sawitzke, 2013)]* ..... *70*

*Tableau VI : répartition en fonction du sexe des chevaux dont sont issus les liquides synoviaux composant la banque de liquides synoviaux pathologiques* ..... *89*

*Tableau VII : détail des pathologies rencontrées chez les chevaux dont sont issus les liquides synoviaux composant la banque de liquides synoviaux pathologiques* ..... *92*

*Tableau VIII : résultats des dosages de l'ARN par spectrophotométrie* ..... *112*

*Tableau IX : constitution des mélanges pour la synthèse d'ADNc* ..... *113*

*Tableau X : valeurs de DO mesurées à 450nm* ..... *122*

*Tableau XI : valeurs de DO mesurées à 550nm* ..... *122*

*Tableau XII : valeurs de DO corrigées* ..... *123*

*Tableau XIII : concentrations en TNFα dans les échantillons de LS* ..... *124*

*Tableau XIV : couleur, turbidité et viscosité du LS* ..... *127*

## Table des abréviations

A : absorption

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

BMP : *bone morphogenetic protein*, protéine pure ostéo-inductrice

CDMP : *cartilage derived morphogenetic protein*, protéine morphogénétique dérivée du cartilage

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

COX : cyclo-oxygénase

CRP : protéine C-réactive

CSM : cellule stromale mésenchymateuse

DAF : *complement decay accelerating factor*, facteur modulateur de l'activité du complément

DO : densité optique

FACS : *fluorescence activated cell sorting*, triage de cellules fluorescentes

FDA : *US food and drug administration*, administration de l'alimentation et des médicaments des Etats-Unis

FGF : *fibroblast growth factor*, facteur de croissance des fibroblastes

GAG : glycosaminoglycanes

HA : acide hyaluronique

HK : *housekeeping*, gène de ménage

HSC : cellule souche hématopoïétique

IDO : indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase

IGF : *insulin growth factor*, facteur de croissance analogue à l'insuline

IL : interleukine

IMC : indice de masse corporelle

IP : iodure de propidium

IRAP : *interleukin-1 receptor antagonist protein*, protéine antagoniste du récepteur à l'interleukine 1

IRM : imagerie par résonance magnétique

LS : liquide synovial

L-PRP : *leukocyte-platelet rich plasma*, plasma riche en plaquettes et en leucocytes LS : liquide synovial

MMP : métalloprotéinase

OC : ostéochondrose

OCD : ostéochondrite disséquante

PCR :*polymerase chain reaction,* réaction en chaîne par polymérase

PG : prostaglandine

PRF : *platelet rich* fibrin, fibrine riche en plaquette

PRG : protéoglycanes

PRP : *platelet rich plasm*, plasma riche en plaquette

PSGAGs : glycosaminoglycanes polysulfatés

P-PRP : *pure-platelet rich plasma*, plasma riche en plaquette pur

SALP : phospholipides tensio-actifs

TGF : *transforming growth factor*, facteur de croissance transformant

TIMPs : *tissue inhibitors of metalloproteases*, inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases

TNF : *tumor necrosis factor*, facteur de nécrose tumorale

VEGF : *vascular endothelial growth factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

# Introduction

L'ostéoarthrose a longtemps été considérée comme une affection articulaire résultant d'une simple usure du cartilage. Or, on sait aujourd'hui que c'est une maladie beaucoup plus complexe impliquant l'ensemble des composants articulaires et admettant une composante inflammatoire non négligeable. De diagnostic difficile et délicat surtout aux premiers stades de la maladie, le traitement de l'ostéoarthrose s'avère également imparfait et se résume le plus souvent à une prise en charge de la douleur à un stade lésionnel irréversible.

Beaucoup d'espoirs sont fondés dans les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) pour traiter les patients atteints d'ostéoarthrose. En effet, les CSM, de par leurs capacités de différenciation permettent de toucher du doigt la possibilité de régénérer le cartilage lésé grâce à un traitement non dopant et non délétère pour l'homéostasie de l'organe diarthrosique. Les CSM ont ainsi été initialement employées afin de réaliser de véritables greffes de cartilage hyalin. Néanmoins, le résultat sur les articulations ostéoarthrosiques s'est révélé approximatif. De ce fait, de nombreuses études ont été menées pour comprendre le mode d'action des CSM sur l'ostéoarthrose et il est apparu que les CSM agiraient plutôt *via* leurs sécrétions dépendantes de leur microenvironnement. Le mécanisme exact reste cependant incertain.

Ainsi, dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'influence du liquide synovial en tant que microenvironnement sur les CSM. Nous avons cherché à établir un protocole d'expérimentation *in vitro* permettant de caractériser le liquide synovial issu d'articulation ostéoarthrosique et de mesurer son influence sur les CSM afin de mieux appréhender le mécanisme d'action des CSM dans le traitement de l'ostéoarthrose et d'améliorer les biothérapies intra-articulaires.

## PARTIE I : étude bibliographique

### I. L'organe diarthrosique

Une articulation se définit comme le lieu de réunion d'un ou de plusieurs os (Garnier, 2004). Il en existe plusieurs types (Barone, 2000): les synarthroses, articulations très peu mobiles et à surfaces articulaires continues (exemple : les os du crâne) ; les amphiarthroses ou symphyses, articulations semi-mobiles où les os sont joints par du tissu fibreux ou du fibrocartilage (exemple : l'articulation sacro-illiaque) ; et enfin les diarthroses ou articulations synoviales. Ces dernières sont des articulations mobiles composées tout d'abord de deux os ou plus comportant chacun un cartilage articulaire, un cartilage calcifié, un os sous-chondral et un os spongieux sous-jacent. Ensuite, ces diarthroses possèdent aussi une membrane synoviale, du liquide synovial (LS), une capsule articulaire et parfois des ligaments et d'un ou deux ménisques fibrocartilagineux (fig 1).

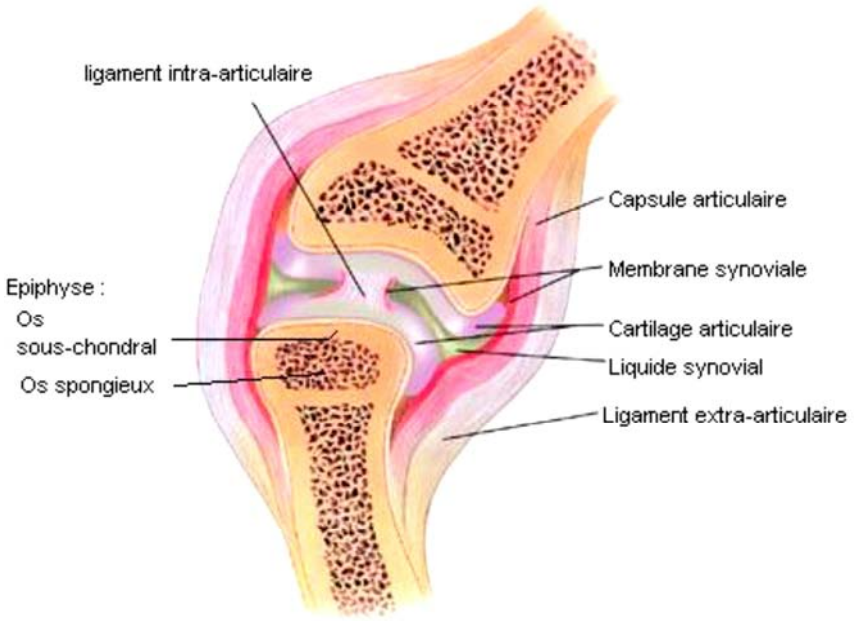



Figure 1 : schéma d'une diarthrose (McIlwraith, 2001)

Plus qu'une simple articulation, une diarthrose peut être considérée comme un véritable organe (Loeser R. S., 2012). En effet, on définit un organe comme étant un élément anatomique distinct exerçant une fonction particulière (Garnier, 2004). Or, une diarthrose est organisée dans un seul but : permettre l'apposition de deux surfaces articulaires en mouvement et en charge sans douleur en répartissant les forces qui lui sont soumises à l'ensemble des structures articulaires et en maintenant la stabilité de l'élément anatomique lors du mouvement (Dieppe, 1998).

Ainsi, on peut qualifier la diarthrose d' « organe articulaire ». Cette notion donne une bonne idée des relations serrées qu'entretiennent les différents tissus d'une diarthrose tant sur le plan

anatomique que fonctionnel. De même, on comprend mieux que toute modification de l'homéostasie aura des conséquences sur les articulations au même titre que n'importe quel organe. Nous allons donc commencer par détailler les différents tissus de cet organe articulaire afin de mieux comprendre son fonctionnement.

### A. Le cartilage articulaire : structure centrale de la diarthrose

Le cartilage articulaire, ou cartilage hyalin recouvre la surface des os constituants les articulations synoviales. Le cartilage hyalin normal est brillant, humide, nacré et apparaît lisse sans aucune aspérité (fig 2).

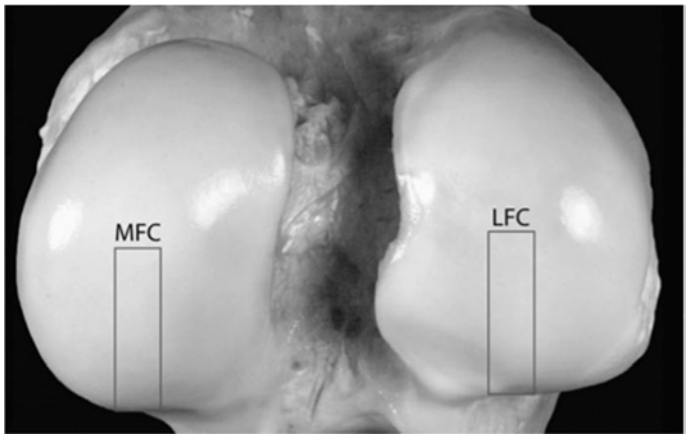



**Figure 2 : vue plantaire d'une épiphyse fémorale de cheval révélant les condyles fémoraux latéral (LFC) et médial (MFC) (Cluzel, 2013)**

Cependant, observée au microscope électronique la surface du cartilage apparait légèrement ondulée avec des dépressions pouvant correspondre aux espaces entre les chondrocytes. La taille de ces espaces a été estimée à environ 20 à 40 µm de diamètre avec une densité d'environ 430 espaces/mm$^3$ (fig 3) (Frisbie D. , 2006).

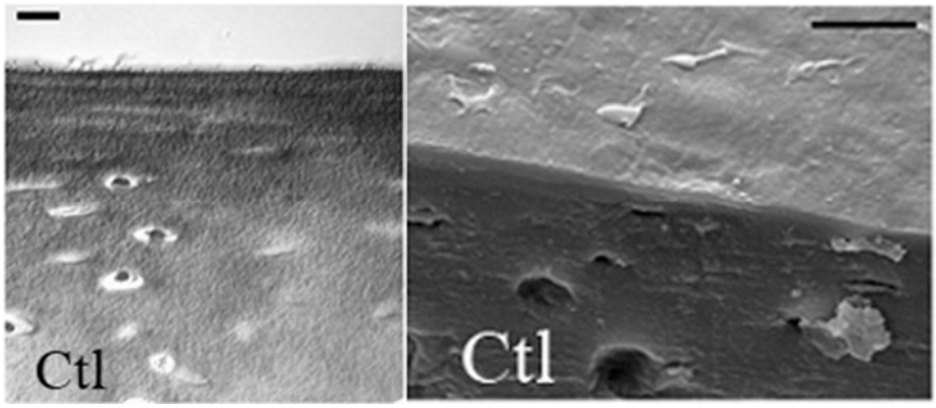



**Figure 3 : cartilage articulaire sain observé au microscope électronique (Desrochers, 2013)**

Chez le cheval, l'épaisseur du cartilage hyalin varie en fonction de l'articulation, de l'âge de l'animal et de la force qui lui est potentiellement appliquée (Frisbie D. , 2006). Ainsi, l'épaisseur n'est pas uniforme sur toute la surface articulaire puisque le cartilage présente des valeurs maximales dans les zones soumises aux sollicitations mécaniques les plus importantes (Murray, 1999) (Muehleman, 2000). Par exemple pour un boulet au niveau d'un condyle métacarpien, l'épaisseur peut varier de 0,921 mm dans la zone dorso-proximale à 0,542 mm dans la zone la plus fine palmaro-proximale (Norrdin, 1999). Cependant, on estime l'épaisseur du cartilage normal à 1 à 4 millimètres (Frisbie D. , 2006).

Ce tissu spécialisé comprend un seul type cellulaire, les chondrocytes, et une importante matrice extracellulaire. La quantité de chondrocytes est très faible dans le cartilage articulaire par rapport aux autres tissus conjonctifs. Effectivement, ils occupent moins du dixième du volume total et la densité cellulaire moyenne est par exemple de $23{,}23.10^{-3}$/mm3 dans le cartilage articulaire du sacrum d'un homme adulte (McLauchlan, 2001).

### 1. Organisation du cartilage articulaire

Le cartilage est organisé en plusieurs couches. Ces couches se distinguent les unes des autres par leur composition, l'apparence des chondrocytes et l'orientation des fibres de collagène (fig 4).

- LA ZONE SUPERFICIELLE qui contient la plus grande densité de chondrocytes. Ceux-ci sont ovoïdes et l'axe le plus long de la cellule est parallèle à la surface du cartilage. Les chondrocytes de cette couche ont la particularité de synthétiser la lubricine, aussi appelée protéine de la zone superficielle ou protéoglycane (PRG4). La lubricine est impliqué dans la défense contre le développement de l'arthrose (Ogawa, 2014). Le collagène dans cette partie du cartilage est très compact. Les fibres sont elles aussi parallèles à la surface du cartilage. On note également la présence de quelques fibres d'élastine chez le jeune. Cette zone représente environ 10 à 20% de l'épaisseur totale du cartilage (Frisbie D. , 2012) (Menard, 2015).

- LA ZONE INTERMEDIAIRE ou transitionnelle qui se caractérise par une densité de chondrocytes moindre mais une concentration en aggrécanes plus élevée. De plus, les chondrocytes sont plus ronds et les fibres de collagène, de diamètre plus grand, n'ont pas d'orientation préférentielle. Cette zone représente 40 à 60% de l'épaisseur totale du cartilage (Frisbie D. , 2012).

- LA ZONE PROFONDE dans laquelle les chondrocytes sont les plus grands. La densité cellulaire continue à décroître dans cette couche et la concentration en aggrécanes continue à augmenter. Contrairement à la zone superficielle, les chondrocytes sont aplatis mais l'axe le plus long de la cellule est orienté perpendiculairement à la surface du cartilage. Les colonnes verticales de chondrocytes sont séparées par des fibres de collagène dont le diamètre est maximal dans cette couche. Cette zone représente environ 30% de l'épaisseur du cartilage (Frisbie D. , 2012).

- LA ZONE CALCIFIEE est constituée uniquement de matrice extra-cellulaire et de cellules calcifiées (chondrocytes hypertrophiques). Elle est délimitée superficiellement par la ligne de démarcation de minéralisation (*tide mark* ou limite entre le cartilage calcifié et non-calcifié). En profondeur, la limite est représentée par la plaque sous-chondrale. La zone calcifiée est une interface plus ou moins tortueuse servant d'ancrage au cartilage hyalin sur la plaque sous-chondrale (Frisbie D. , 2012). La zone calcifiée représente 5 à 10% de l'épaisseur totale du cartilage (Oegema, 1995).

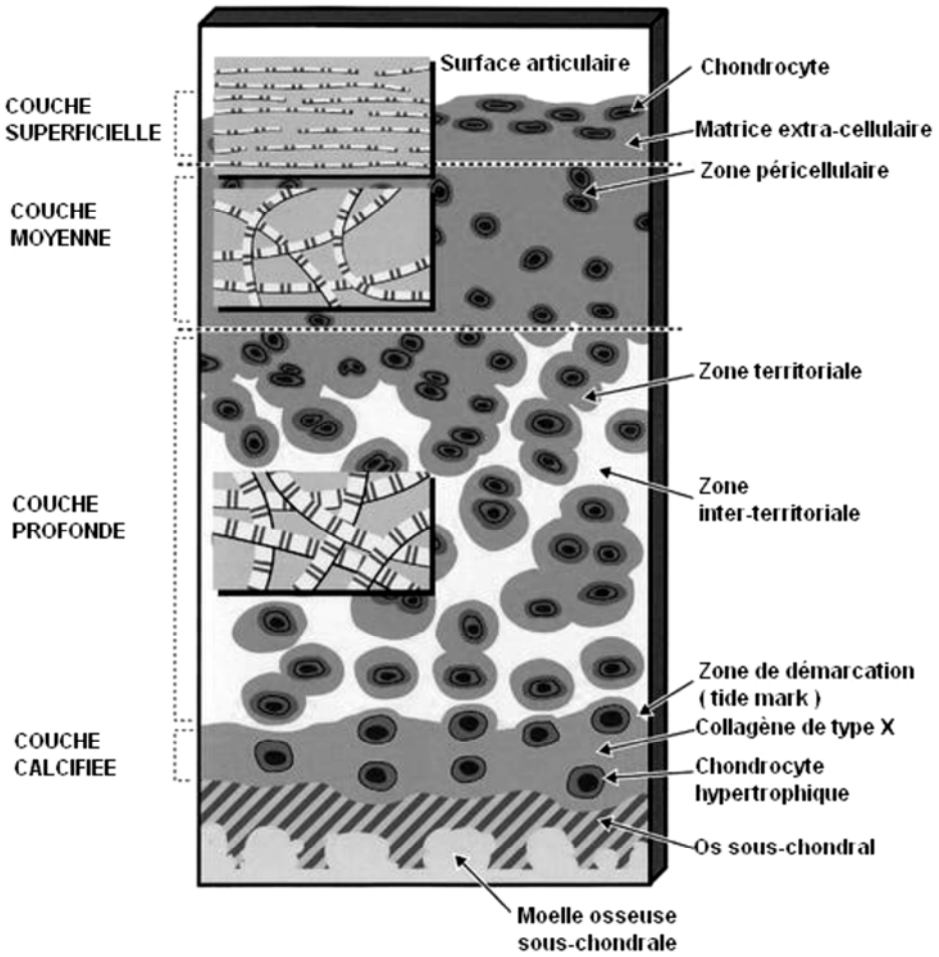



Figure 4 : structure du cartilage articulaire sain chez l'adulte (Poole, 2001)

## 2. Composition du cartilage articulaire

Le cartilage hyalin est principalement composé d'eau. Vient ensuite la matrice extracellulaire, elle-même constituée de collagène de type II et de protéoglycanes, puis les chondrocytes. Le cartilage articulaire ne contient ni nerfs ni vaisseaux sanguins (fig 5) (Oei, 2014).

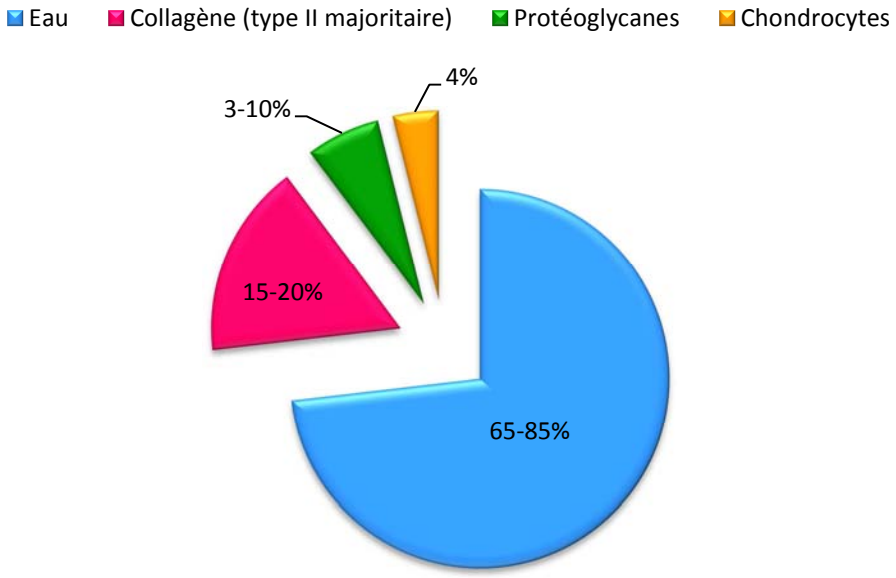



Figure 5 : composition relative du cartilage articulaire d'après Oei, 2014

### a. Les chondrocytes, unique type cellulaire du cartilage (Archer, 2003) (Frisbie D. , 2012)

A l'origine, les cellules mésenchymateuses se différencient en chondroblastes, forme cellulaire immature, puis en chondrocytes. Ces derniers peuvent exprimer deux phénotypes : hypertrophique ou non hypertrophique.

Les chondrocytes du cartilage articulaire dans sa partie non calcifiée sont non hypertrophiques et ont pour fonction de synthétiser et d'entretenir la matrice cartilagineuse. Ils possèdent donc la machinerie nécessaire à l'anabolisme et au catabolisme de la matrice extracellulaire qui comprend : collagènes (en particulier de type II), glycosaminoglycanes, protéines structurales de la matrices et des enzymes inactives : proenzymes des protéases et des collagénases. Ils peuvent encore se diviser.

Les chondrocytes de la couche calcifiée expriment le phénotype hypertrophique, ils peuvent minéraliser la matrice extracellulaire et synthétiser en particulier du collagène de type X mais ne peuvent plus se diviser.

Les chondrocytes articulaires non hypertrophiques se différencient naturellement en chondrocytes hypertrophiques mais il existe des facteurs inhibant l'hypertrophie.

D'autre part, les chondrocytes possèdent des récepteurs de surface aux différents composants de la matrice (intégrines, anexine V…) ainsi que des expansions cytoplasmiques. Il existe donc des interactions directes entre les chondrocytes et les autres éléments composants le cartilage. Cependant, les chondrocytes n'ont pas de contact entre eux contrairement aux ostéocytes. Ce serait par ces expansions cytoplasmiques que la cellule serait capable de répondre en partie à la charge du cartilage articulaire.

### b. Les protéoglycanes (Fox, 2009) (Frisbie D. , 2012) (Roughley, 2006)

Les protéoglycanes sont des structures complexes. Ils ont pour base une très longue chaine protéique. Sur cette protéine, des glycosaminoglycanes s'attachent perpendiculairement pour former une structure ressemblant à un arbre (fig 6). Les glycosaminoglycanes présents dans le cartilage articulaire sont les chondroïtines sulfate 4 et 6 et les kératanes sulfate. Le ratio varie en fonction de l'âge de l'animal. Ainsi, il y aura un taux plus élevé de chondroïtine sulfate 6 dans les cartilages articulaires des animaux matures. Les glycosaminoglycanes se fixent de façon covalente sur la protéine avec une centaine de chondroïtine sulfate que l'on trouve du côté carboxyle de la protéine et une centaine de kératanes sulfate préférentiellement du côté N-terminal.

Les protéoglycanes se fixent ensuite par l'intermédiaire de protéines de liaison sur l'acide hyaluronique pour former une macromolécule. Cette dernière possède une particularité importante pour le cartilage : elle est hygroscopique ce qui signifie qu'elle a la capacité de retenir l'eau. En effet, les glycosaminoglycanes sont chargés négativement et tendent donc à se repousser. Elles créent ainsi une pression osmotique positive qui attire l'eau. De cette façon, les glycosaminoglycanes assurent la formation d'un gel et la circulation d'eau et des éléments essentiels à la survie et aux fonctions du cartilage.

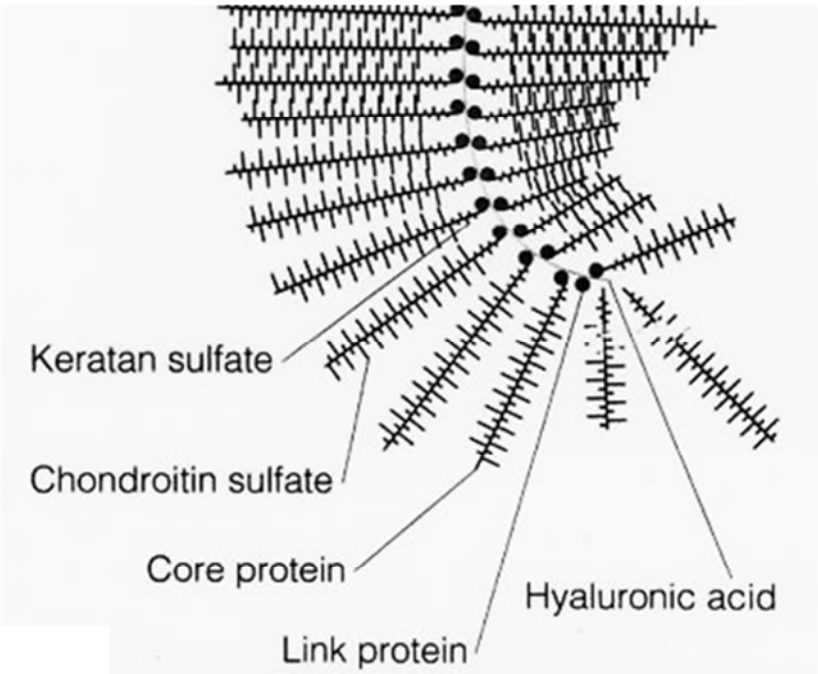



Figure 6 : schéma d'un protéoglycane (Roughley, 2006)

Les protéoglycanes sont fixés au sein du cartilage par l'acide hyaluronique qui se fixe par l'intermédiaire des récepteurs CD44 aux chondrocytes (fig 7).

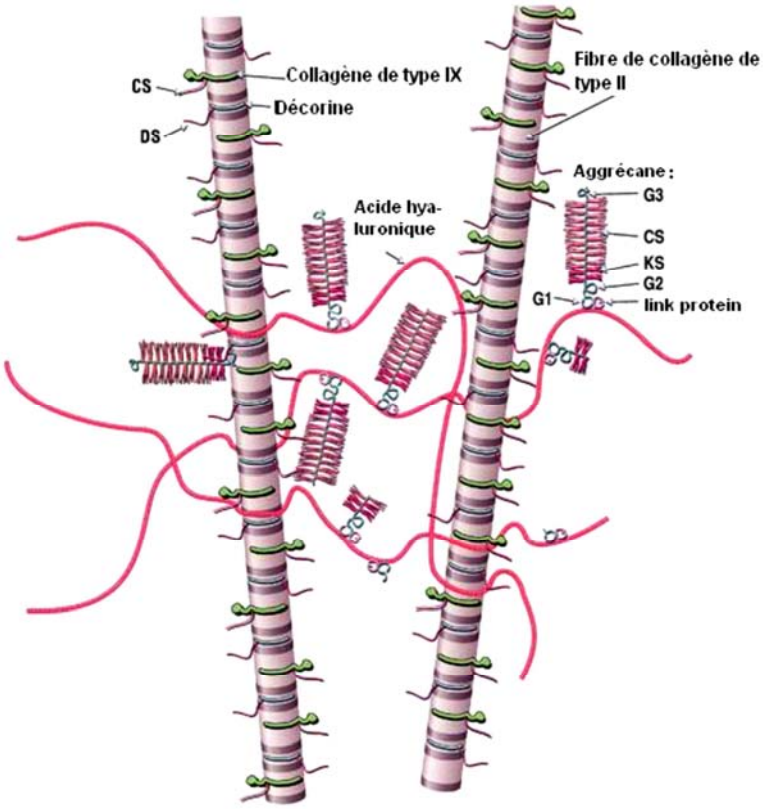



Figure 7 : structure de la matrice cartilagineuse (Poole, 2001)

### c. Les fibres de collagène

Le collagène de type II est une structure polypeptidique à trois brins organisée sous la forme d'une hélice. Il représente 90 à 95% du collagène total présent dans l'articulation. On trouve des types minoritaires de collagènes comme les types IX et XI, aussi organisés en fibrilles. Les fibres de collagène constituent la trame de la matrice cartilagineuse. Avec la substance fondamentale, elles forment un réseau fibrillaire dont la cohésion est assurée par des glycoprotéines de liaison et par des interactions électrostatiques. Sa structure en triple hélice ainsi que la force des liaisons covalentes intra- et inter-moléculaires lui confèrent une bonne rigidité (fig 8) (Landinez-Parra, 2012) (Martel-Pelletier, 2004).

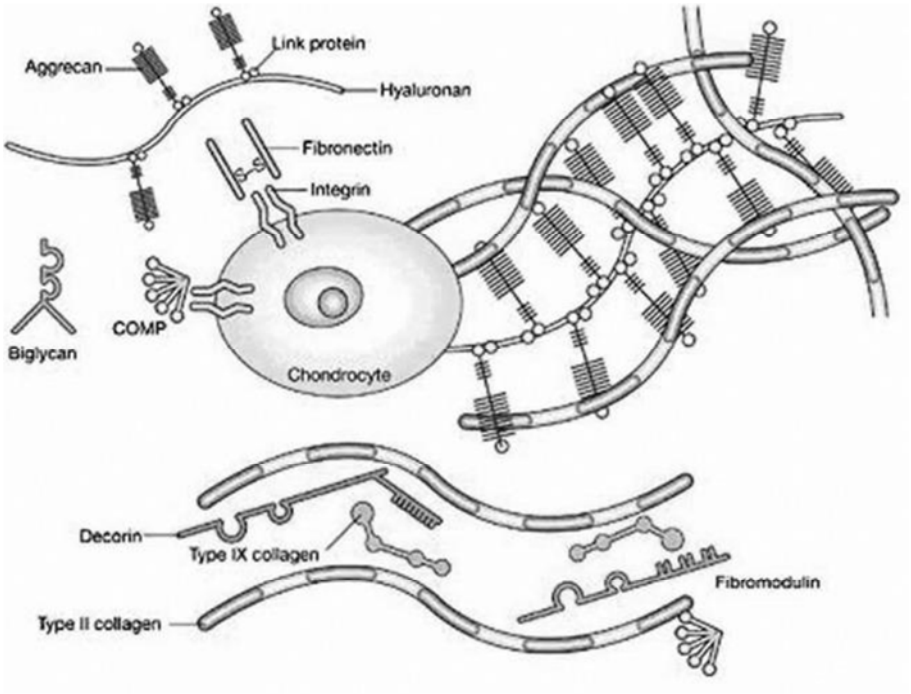



Figure 8 : organisation des fibres de collagène au sein du cartilage articulaire (Fox, 2009)

Dans la zone superficielle, les fibres de collagène sont organisées en un dense réseau de fibres parallèles à la surface de l'articulation (fig 9). Le collagène dans cette zone a un plus petit diamètre que dans le reste du cartilage. Cette organisation des fibres permet la présence de petites ouvertures dans la couche superficielle estimées à environ 6 nm de diamètre. Ces ouvertures sont bien entendues insuffisantes pour laisser passer les plus grosses protéines présentes dans le liquide synovial. Cependant, les petites molécules comme le glucose et les ions peuvent facilement passer à travers ces structures (Frisbie, 2012) (Fox, 2009).

Dans les couches situées en dessous, les fibres de collagènes sont plus larges. Ces fibres sont positionnées en forme de ponts ou d'arches appelées *Arches de Bennighoff*. Ainsi en fonction de la

profondeur, l'orientation des fibres varie. En surface de la zone, le collagène sera parallèle à la surface de l'articulation (fig 9). Un peu plus profondément, elles vont apparaitre comme un réseau de fibres entrelacées. A la base du cartilage, à proximité de la plaque osseuse sous-chondrale, les fibres de collagène seront perpendiculaires à la surface de l'os. Cette organisation en arcade permet d'assurer la souplesse mais aussi la résistance du cartilage aux contraintes qui lui sont imposées (Weisbrode, 2006).

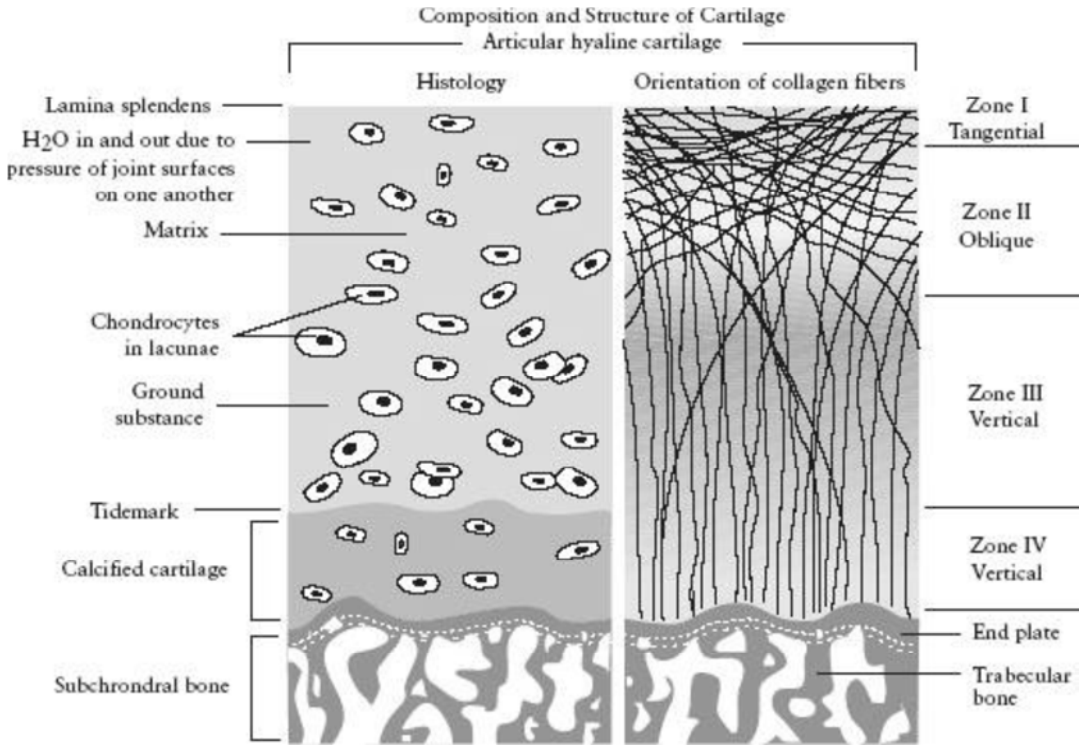



Figure 9 : organisation des fibres de collagène et histologie du cartilage articulaire (Gross, 2009)

### 3. Fonctions du cartilage (Archer, 2003) (Frisbie D. , 2012)

Le cartilage articulaire, de part à ses propriétés tribologiques et rhéologiques, permet le glissement des surfaces articulaires lors de la mobilisation de l'articulation et confère à cette dernière une grande force de résistance aux contraintes mécaniques (Noble, 2010).

En effet, le cartilage articulaire fonctionne un peu comme une éponge. Au repos, il existe un équilibre homéostatique entre les composants du cartilage et les éléments qui l'entourent. La résistance du collagène et la pression osmotique développée par l'eau retenue par les protéoglycanes ainsi celle développée par le LSI permettent d'éviter la déformation du cartilage. Lorsque l'articulation est mise en contrainte, le cartilage se déforme et permet la sortie des molécules d'eau de la structure. La pression osmotique dans l'espace articulaire augmente. Un nouvel état d'équilibre se crée. A la fin du mouvement, la force de pression exercée sur le cartilage

diminue. L'eau présente dans l'espace articulaire est réabsorbée par les molécules du cartilage. Il y a alors retour de la structure à son état d'équilibre d'origine (fig 10). Ce phénomène permet par ailleurs la nutrition du cartilage. En effet, le cartilage n'est ni vascularisé, ni innervé. Ainsi, la nutrition se fait dans sa totalité par imbibition (Igbal, 2012). Seules les parties les plus périphériques du cartilage immature bénéficient d'apports de nutriments par les cercles artériels péri-cartilagineux et les parties les plus profondes par les vaisseaux médullaires. Mais chez l'adulte, la plaque sous-chondrale isole totalement le cartilage articulaire de la vascularisation épiphysaire. Les nutriments doivent donc traverser la matrice pour atteindre les chondrocytes et sont de ce fait tributaires du filtre créé par l'imbrication des protéoglycanes et du collagène. Leurs caractéristiques physiques (taille<69Da et forme) ainsi que leurs propriétés électrostatiques auront donc des conséquences importantes sur leur perméabilité. Le mouvement permet donc la nutrition du cartilage par imbibition. Une articulation immobilisée ne peut ainsi plus permettre une bonne nutrition.

De plus, la déformation du cartilage lors de la mise sous contrainte de l'articulation permet à cette dernière de supporter des charges importantes. Effectivement, la déformation permet une répartition des charges et augmente les zones de contact. De ce fait, la congruence des surfaces articulaires est augmentée, ce qui favorise la stabilité de l'articulation.

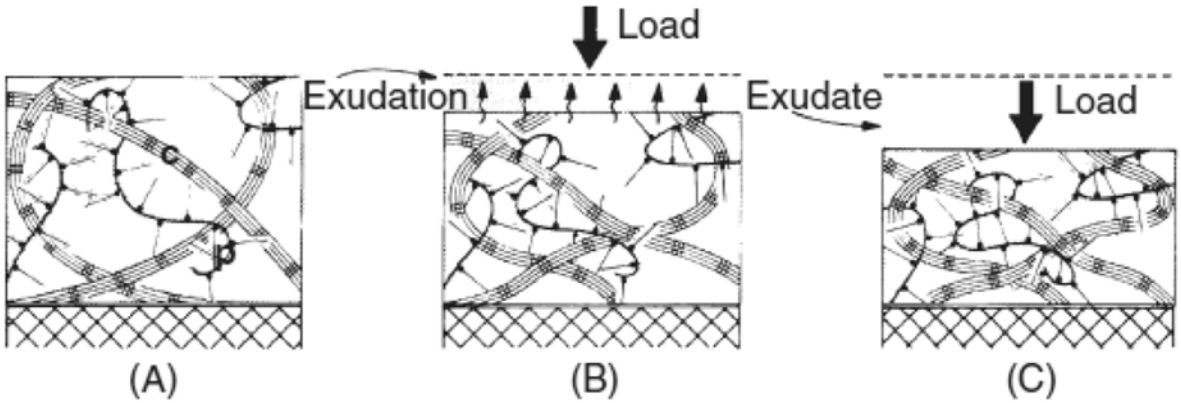



**Figure 10 : elasticité du cartilage et mode de nutrition (Auer, 2012)**

*(A) Cartilage au repos. (B) Lors de la mise en charge, on note une compression des fibres et le liquide contenu dans le cartilage est alors évacué de manière rapide et continue de manière plus lente lors de la phase (C). Lors du retour à l'équilibre, du liquide synovial est réabsorbé dans le cartilage.*

Enfin, le cartilage hyalin fait partie du système de glissement de l'articulation avec la membrane et le liquide synovial. En effet, la lubrification articulaire est un système élasto-hydro-dynamique pressurisé, ce qui signifie qu'un mouvement entraine une déformation du cartilage laquelle libère une substance (eau et électrolytes) en zone comprimée et la réabsorbe en zone déchargée comme décrit précédemment. Le gel formé notamment par l'arborescence des chaînes glucidiques des protéoglycanes à la surface du cartilage se gorge ainsi d'eau en zone comprimée et

favorise le glissement articulaire lors du mouvement (Boutrand, 1994) (Noble, 2010). L'implication de la membrane synoviale et du LS dans ce phénomène sera décrit plus loin.

### B. Les structures osseuses de l'organe articulaire

En profondeur de la couche cartilagineuse, on trouve une couche dense et solide appelée la plaque osseuse sous-chondrale (POSC) séparant le cartilage calcifié de la moelle osseuse (fig 11).

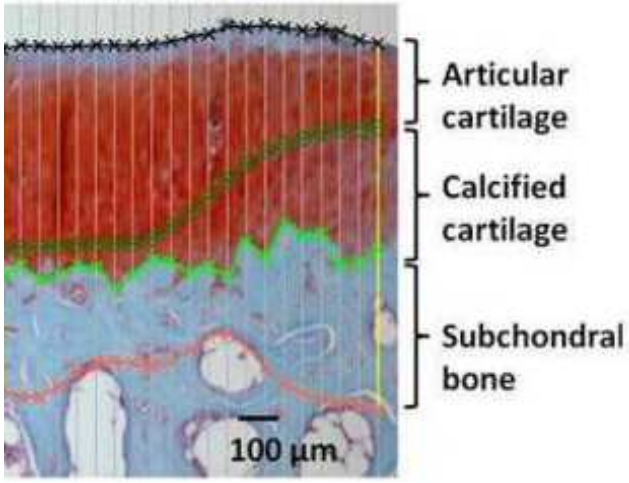



**Figure 11 : position de l'os sous-chondrale (coloration safranine O et fast green) (Roemhildt, 2012)**

L'os sous-chondral peut être séparé en deux entités distinctes : l'os sous-chondral cortical et l'os sous-chondral trabéculaire (fig 12).

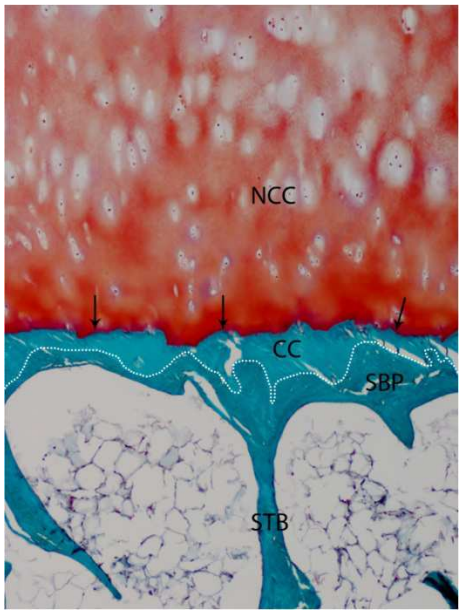



**Figure 12 : structure de l'os sous-chondral dans une articulation humaine saine (Li, 2013)**

*CC : cartilage calcifié ; CCN : cartilage non calcifié ; SBP : os sous-chondral cortical ; STB : os sous-chondral trabéculaire*

L'os sous-chondral possède une porosité marquée. En effet, il est envahi par des canaux permettant le passage d'artères, de veines et de nerfs notamment dans sa partie trabéculaire. Ainsi, l'os sous-chondral exerce les fonctions d'amortisseur et de soutien, et joue également un rôle important dans la nutrition et le métabolisme articulaire (Li, 2013).

Par ailleurs, l'épaisseur de l'os sous-chondral, plus faible que l'os cortical adjacent, est variable au sein même de l'articulation, selon l'articulation, l'âge (elle diminue avec l'âge), la charge et l'activité. Elle augmente avec l'intensité de l'exercice chez le cheval. En effet, l'os sous-chondral présente une anisotropie structurelle et mécanique significative lui permettant de s'organiser en fonction des forces qui s'exercent sur lui lors de sa croissance ou lors de contraintes importantes. Selon la loi de Wolff, les travées vont s'orienter dans le même sens que les lignes de contraintes qui lui sont appliquées. Ce remodelage ne s'applique qu'à des contraintes fréquentes lors d'exercices répétés par exemple et non à des contraintes brutales et ponctuelles (Müller-Gerbl, 1998) (Tamba, 2005) (Li, 2013).

Ces remaniements sont possibles car, comme dans tout tissu osseux, l'os sous-chondral dispose de la machinerie enzymatique nécessaire. On retrouve des cellules stromales précurseurs des ostéoblastes et des ostéoclastes dans l'endoste. Après différenciation, les ostéoblastes sont les principaux producteurs de la matrice osseuse (principalement formée d'une trame de collagène de type I emprisonnant des cristaux d'hydroxyapatite) puis se différencient en ostéocytes dans les lacunes des ostéons et envoient des extensions vers les autres lacunes. Les ostéocytes participent donc au maintien du bon état de l'os existant. Les ostéoclastes participent, quant à eux, à la résorption osseuse. Les médiateurs de ces remaniements sont en partie les mêmes cytokines et facteurs de croissance qui agissent dans le cartilage sur les chondrocytes (Müller-Gerbl, 1998) (Tamba, 2005).

L'os sous-chondral a comme fonction principale de répartir les contraintes mécaniques et les chocs. Nous avons vu précédemment que le cartilage absorbe très bien les contraintes mécaniques mais en raison de sa faible épaisseur, ce sont finalement dans les structures osseuses que les forces de contrainte se répartiront ainsi que dans les tissus mous péri-articulaires. Du fait de sa structure trabéculaire décrite précédemment, on comprend aisément que l'os sous-chondral est capable d'absorber beaucoup d'énergie lorsqu'on lui soumet une charge. L'os sous-chondral joue aussi un rôle dans le maintien de la forme de l'articulation et du jeu de congruence des surfaces articulaires. Pour que les pressions exercées sur le cartilage ne soient pas focales, l'os sous-chondral entretient une certaine incongruence des surfaces articulaires lorsqu'elles ne sont pas soumises à une charge.

Ainsi, lorsque des charges importantes leur sont appliquées, les deux surfaces sont congruentes et les forces sont réparties sur leur ensemble (Müller-Gerbl, 1998) (Tamba, 2005).

L'os sous-chondral entretient donc des relations étroites avec le cartilage et fait ainsi sans aucun doute partie intégrante de l'organe articulaire.

## C. La membrane synoviale

### 1. Composition du synovium

La membrane synoviale ou synovium est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse qui recouvre toute la surface interne de l'articulation à l'exception de la surface du cartilage et qui s'insère dans le périoste avec lequel il s'entrelace. Macroscopiquement, la surface du synovium présente des villosités qui augmentent la surface de contact avec la cavité articulaire et donc la surface d'échange (Auer, 2012) (fig 13).

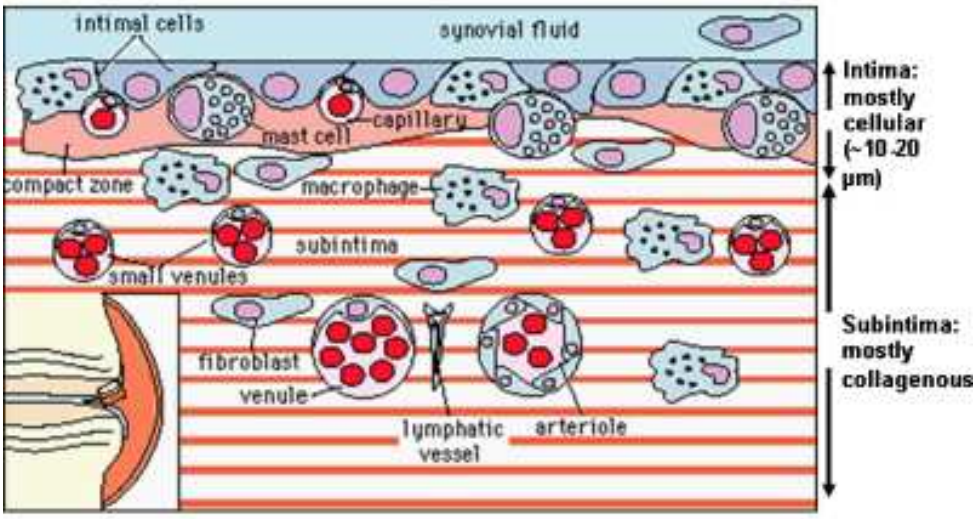



Figure 13 : description schématique des structures des deux couches du synovium (Tiwari, 2010)

Deux couches composent la membrane synoviale : (Smith M. , 2011) (Tiwari, 2010) (Frisbie D. , 2012)

- L'INTIMA qui est au contact du liquide synovial, est une couche discontinue de 1 à 3 cellules d'épaisseur (10 à 30 µm d'épaisseur) qui ne possède pas de membrane basale. Elle est constituée de synoviocytes de trois types :
  - les synoviocytes de type A, les plus nombreux, proviennent essentiellement de la moelle osseuse. Ces cellules ont une activité essentiellement phagocytaire et interviennent dans la résorption de la synovie et des déchets éventuels.

- les synoviocytes de type B qui ont un rôle dans l'élaboration du LS et de l'acide hyaluronique. De plus, sous l'influence de certaines cytokines comme l'IL-1, ces synoviocytes peuvent synthétiser des molécules pro-inflammatoires telles que des métalloprotéines, des radicaux libres, des cytokines (IL-1, TNF-α).
- les synoviocytes de type C ont une activité intermédiaire, entre cellules A et B.

- LA SUB-INTIMA est formée d'un réseau de fibres de collagène et d'une substance intercellulaire riche en acide hyaluronique. Alors que l'intima est uniforme sur toute l'articulation, la sub-intima de par sa composition, peut être classée en trois types : fibreux, aréolaire et adipeux. Le type fibreux, qui possède plus de collagène, se retrouve particulièrement dans les zones de fortes tensions. Le type aréolaire, qui comporte davantage de matrice, se retrouve quant à lui plus fréquemment dans les zones où le synovium est indépendant de la capsule articulaire (zone de mouvement important). Enfin, le type adipeux, riche en adipocytes, est localisé au niveau des tissus gras, comme les coussinets adipeux patellaires.
  En outre, la sub-intima est également innervée par des nerfs périphériques et musculaires. Elle donne ainsi une partie de sa sensibilité à l'organe articulaire. La sub-intima compte aussi un nombre important de vaisseaux lymphatiques et de capillaires sanguins, généralement de type continu.

### 2. Les indispensables fonctions de la membrane synoviale (Scanzello, 2012) (Tiwari, 2010)

La membrane synoviale remplit plusieurs rôles prépondérants pour l'organe diarthrosique. Tout d'abord, elle fournit un « emballage » déformable qui permet le mouvement des tissus adjacents, bien moins déformables. Par ailleurs, la membrane synoviale est essentielle à la protection et au maintien de l'intégrité du cartilage articulaire. En effet, la production d'acide hyaluronique par les synoviocytes de type B permet de réduire le coefficient de friction existant lors du mouvement. De plus, les synoviocytes de l'intima ont également un rôle dans la cicatrisation et dans l'inhibition de la formation de fibrine grâce à la synthèse d'activateur du plasminogène et de DAF (complement decay-accelerating factor), régulateur du système du complément.

La membrane synoviale a une implication particulière dans la régulation de la composition du LS. En effet, comme nous l'avons détaillé, le synovium est composé de couches de cellules discontinues qui constituent un filtre pour le liquide provenant des capillaires sanguins de la sub-intima. Pour les petites molécules (<10 kDa) et les ions, les échanges se font par diffusion grâce au

gradient créé par la concentration importante en acide hyaluronique de la substance intercellulaire de la sub-intima. En effet, l'acide hyaluronique a un poids moléculaire élevé (1200 kDa), ce qui représente une pression oncotique plus élevée que celle du sang. Selon la loi de Starling, cela crée un appel de molécules de petite taille dans le LS. Le LS est ensuite réabsorbé par les capillaires sanguins et le réseau lymphatique. Ainsi, la membrane synoviale permet l'élaboration du LS grâce à des processus de filtration plasmatique et de synthèses, fortement influencés par différents paramètres comme l'inflammation ou la qualité du drainage lymphatique.

## D. Le liquide synovial sain

### 1. Un dialysat sanguin modifié

Le liquide synovial, parfois appelé synovie, est un dialysat modifié, proche du plasma mais moins riche en protéines et en cellules (absence de globules rouges). On peut aussi noter qu'un LS sain ne contient pas de fibrinogène, ainsi il ne coagulera pas. Le liquide synovial normal est jaune très pâle, visqueux et filant (Noble, 2010). Il est en grande partie composé d'eau (tab I).

**Tableau I : caractéristiques du liquide synovial normal d'après Marchat, 2010**

| COMPOSITION PHYSIQUE | |
|---|---|
| **Acide hyaluronique** | 1-1,5 g/L |
| **Protéines totales** | < 10 g/L |
| **Phosphatases alcalines** | < 90 UI/L |
| **LDH** | < 100 UI/L |
| **ASAT** | < 250 UI/L |
| **Glucose** | 0,3-0,7 g/L |
| **CYTOLOGIE** | |
| **Leucocytes** | < 200 cellules/µL |
| **Lymphocytes** | 30-60 % |
| **Neutrophiles** | < 10% |
| **Eosinophiles** | < 1% |
| **Basophiles** | absents |

## 2. Nutrition et lubrification articulaire

La synovie rempli deux rôles principaux dans l'organe articulaire (Noble, 2010). Tout d'abord, comme décrit précédemment, elle assure la nutrition des cartilages hyalins et constitue leur principale interface alimentaire. Le cartilage n'étant pas non plus innervé le LS est également son interface de communication et l'on pourra donc y trouver le reflet de l'état métabolique du cartilage (Blewis, 2007).

Le deuxième rôle de la synovie est d'assurer la lubrification des surfaces articulaires. Le rôle tribologique de la synovie dépend non seulement des sollicitations locales de l'articulation, c'est-à-dire de l'ensemble moteur (tendons, muscles, ligaments), mais aussi comme nous l'avons vu, des interactions des deux corps en contact (cartilages) qui ont une structure mécanique sophistiquée et des caractéristiques physico-chimiques complexes (Trunfio-Sfarghiu, 2006). Le LS possède une grande capacité de lubrification grâce à des molécules clefs telles que (Blewis, 2007) (Waller, 2013) (Schmidt, 2007) :

- un protéoglycane de type mucine (produit du gène proteoglycan 4 *Prg4*) présent à une concentration de 0,05-0,35 mg/mL
- l'acide hyaluronique (HA) à 1-4 mg/mL
- les phospholipides tensio-actifs (SAPL) à 0,1 mg/mL

Les synoviocytes B sécrètent de la lubricine et constituent la principale source de SAPL et de HA. Les chondrocytes de la couche superficielle du cartilage hyalin, et dans une moindre mesure les cellules méniscales, synthétisent également de la lubricine. Les SAPL présenteraient une organisation en multicouches planes (3 à 7 bicouches lipidiques empilées sur la surface du cartilage), qui serait responsable de leurs propriétés lubrifiantes (Schwarz, 1998). Néanmoins, cette organisation est très instable et va dépendre des propriétés physico-chimiques de la synovie (sels, pH, température, pression hydrostatique…) (Anglin, 2010) (Seantier, 2009). De plus, l'acide hyaluronique est considéré comme le composant responsable des propriétés rhéologiques du LS (Fam H. B., 2007). Effectivement, son haut poids moléculaire (5000 kDa) lui interdit de pénétrer dans le cartilage articulaire, cependant l'acide hyaluronique est très hydrophile et est capable de se lier directement à près de 5000 molécules d'eau. Il confère ainsi à la synovie une viscosité importante et son état de gel (Fam H. K., 2009). Toutefois, si l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire est le plus abondant en conditions physiologiques, en cas d'inflammation ou de pathologies, un autre type d'acide hyaluronique de bas poids moléculaire est synthétisé et participe à la détérioration de la lubrification de l'organe articulaire (Yanagida-Suckawa, 2013).

Par ailleurs, la structure chimique de la lubricine permet de comprendre son rôle majeur de protecteur articulaire, empêchant l'usure du cartilage, la prolifération et l'adhésion des cellules synoviales. En effet, elle possède un domaine *vitronectin-like* lui conférant un rôle d'adhésif moléculaire, capable de se lier aussi bien aux fibres de collagène qu'aux couches lipidiques de la synovie. Un domaine mucin-like, dans lequel d'abondants sucres chargés négativement induisent une force d'hydratation répulsive, lui donne un rôle lubrifiant. Enfin, un domaine hemopexin-like confère à la lubricine un rôle d'antioxydant lipidique et des protéines de liaison. La lubricine diminue également la viscosité du LS conférée par l'acide hyaluronique, ce qui suggère l'existence d'interactions entre les deux molécules qui peuvent facilement affecter le subtil équilibre du LS (Chang, 2008) (Zappone, 2007).

Ainsi, on peut dire que le triplet cartilage-liquide synoviale-cartilage confère à l'organe diarthrosique un réel génie tribologique. Nonobstant, ce système tribologique parfait n'est pas encore complètement élucidé et on ne sait notamment toujours pas comment le coefficient de friction articulaire qui exprime le ratio de la force frictionnelle sur la force normale, peut être proche de zéro. Aucune prothèse articulaire, même avec les derniers matériaux à la pointe de la technologie, ne réussit à avoir une réponse frictionnelle aussi faible (Noble, 2010).

## E. La capsule articulaire et les ligaments (Frandson, 2003) (Auer, 2012) (Barone, 2000)

### 1. La capsule articulaire

La capsule est une structure fibreuse très résistante dont la composition est proche de celle des ligaments : la cellularité est faible et elle comprend majoritairement du collagène, en particulier de type I, des protéoglycanes et de l'eau (plus de 70%). Le collagène de la capsule articulaire est organisé en fibres dont la taille est comprise entre 150 et 1500nm et dont l'orientation varie selon la localisation dans l'articulation. Les fibres les plus superficielles sont orientées dans le sens longitudinal et les plus profondes dans le sens transversal. Elle est doublée intérieurement par la membrane synoviale et extérieurement par des ligaments collatéraux et s'attache en continuité avec le périoste au niveau du cercle périchondral, zone de transition entre le périoste et le cartilage articulaire. L'os et la capsule sont donc fortement liés et la structure de leur attache permet une meilleure distribution des forces de traction exercées sur l'insertion de la capsule.

L'épaisseur de la capsule varie selon l'articulation et au sein même d'une articulation. Ainsi sera-t-elle très fine au niveau du coude ou très épaisse pour former un ligament capsulaire comme par exemple au niveau du boulet.

### 2. Les ligaments

Le ligament est une structure qui permet de solidariser deux os et d'autoriser leur mouvement l'un par rapport à l'autre. Il en existe deux types les ligaments blancs et les ligaments jaunes. Dans le cas des articulations synoviales des membres appendiculaires, on retrouve presque exclusivement des ligaments blancs. Ces derniers sont composés majoritairement de fibres de collagènes et de quelques fibres élastiques unies par un conjonctif moins dense qui contient un réseau vasculaire discret ainsi que des arborisations nerveuses. Les faisceaux de fibres de collagène se calcifient lorsqu'on se rapproche de la jonction avec l'os. Cette transition progressive de la structure près des insertions osseuses renforce le lien avec l'os et diminue le risque d'avulsion ligamentaire.

De plus, du fait de leur composition, ces ligaments blancs sont quasiment inextensibles, contrairement aux ligaments jaunes qui comportent moins de fibres de collagène. Au repos, les fibres de collagènes sont souvent soit ondulées soit spiralées. Elles deviendront rectilignes lors de la mise sous tension. Les ligaments blancs extra-capsulaires ont une orientation directement corrélée à la mécanique de l'articulation.

### 3. Participation à la stabilité articulaire

La structure fibreuse de la capsule et des ligaments confère une part importante de la stabilité articulaire en association avec l'unité musculotendineuse contrôlant l'articulation et la congruence articulaire due à la conformation osseuse de l'articulation. Par ailleurs, la pression intraarticulaire est inférieure à la pression atmosphérique (-2 à -6 cm d'$H_2O$), il y a donc un effet de succion des structures superficielles de l'articulation vers son centre qui participerait aussi à sa stabilisation.

## F. Vascularisation de l'organe diarthrosique (Remy, 2012) (Barone, 2000)

Les articulations synoviales ont une vascularisation riche. Le système trophique permettant l'approvisionnement sanguin de l'articulation s'organise de manière particulière. En effet, depuis

l'axe artériel du membre, se forment des cercles artériels métaphysaire et épiphysaires au niveau respectivement de la métaphyse et de l'épiphyse de chacun des abouts osseux. Ces deux cercles artériels s'anastomosent entre eux et assurent la nutrition de l'os sous-chondral.

Du conjonctif péri-articulaire à la membrane synoviale, les artères et les veines forment une série de réseaux superposés et étagés, de disposition similaire : deux ou trois veines de plus faible calibre accompagnent chaque rameau artériel. La densité de ces réseaux augmente avec la mobilité et l'utilisation de l'articulation.

D'autre part, l'organe diarthrosique bénéficie également d'un drainage lymphatique composé de deux réseaux. Un des réseaux lymphatiques est situé dans la synoviale et l'autre au contact de la face profonde de la capsule fibreuse. Le drainage de ces réseaux est assuré par des vaisseaux lymphatiques qui accompagnent les veines et artères de la région.

### G. Innervation de l'articulation synoviale (Trotter, 1996) (Barone, 2000) (Takeba, 2001)

L'innervation de l'articulation est particulièrement riche, et ce d'autant plus que l'articulation est mobile. Elle est basée sur les rameaux issus des muscles alentours et sur des fibres nerveuses périphériques spécifiques. Les nerfs abordent le plus souvent l'articulation avec les vaisseaux et répartissent leurs fibres en deux couches plexiformes, l'une dans la capsule fibreuse et l'autre plus dense sous la synoviale. Des rameaux se distribuent également dans les ligaments associés à l'articulation. Par ailleurs, l'articulation contient également des récepteurs encapsulés de divers types tels que des corpuscules de Pacini dans le conjonctif articulaire ou les corpuscules de Golgi dans les ligaments. On trouve aussi d'autres mécanorécepteurs dans la capsule articulaire, le périoste et les tendons juxta-articulaires.

Ainsi, la proprioception au sein de la diarthrose est assurée par les fibres sympathiques non myélinisées, les fibres myélinisées de moyen diamètre innervant de petits mécanorécepteurs corpusculaires et quelques fibres myélinisées de gros diamètre innervant de plus gros mécanorécepteurs. Cette proprioception a une grande importance car elle aide à restreindre les mouvements dans les limites physiologiques de l'articulation. Ces fibres participent également à la coordination de l'unité musculo-tendineuse avec les ligaments et la capsule articulaire, permettant ainsi le maintien de la stabilité articulaire.

La nociception, quant à elle, se fait via deux types de fibres : des fibres Aδ de petit diamètre, myélinisées, se terminant sur des mécanorécepteurs et des fibres C amyéliniques, stimulées par des

chocs, des variations importantes de contraintes mécaniques et par des lésions tissulaires. On les trouve dans la capsule articulaire, les ligaments, la lamina propria de la membrane synoviale, le périoste, les coussinets adipeux, une partie des ménisques et les tendons.

D'autre part, des neuropeptides et des enképhalines, molécules intervenant dans la nociception, ont été détectée chez l'homme et le cheval dans la membrane et le LS, les ménisques et le périoste et l'os sous-chondral. Outre la perception de la douleur, ces molécules auraient un rôle dans le métabolisme des cellules de l'os durant la croissance mais aussi lors de phénomènes pathologiques.

## H. L'homéostasie au sein des diarthroses

Les cellules clés de l'homéostasie articulaire sont les chondrocytes et les synoviocytes. Comme nous l'avons vu, ils assurent à la fois la synthèse et le renouvellement de la matrice cartilagineuse et du LS et possèdent aussi la machinerie enzymatique nécessaire pour dégrader leurs constituants.

### 1. Voie des métalloprotéinases (Boire, 2012) (Hurlbeck, 2014)

Les chondrocytes et les synoviocytes synthétisent tout d'abord les métalloprotéases ou métalloprotéinases matricielles (MMP). Ces enzymes sont synthétisées sous forme de pro-enzymes puis métabolisées en trois types de métalloprotéinases matricielles actives :

- Les collagénases (MMP-1, -8 et -13),
- Les stromélysines(MMP-3, -10 et -11),
- Les gélatinases ou collagénases (MMP-2 et -9).

Les collagénases dégradent la triple hélice des collagènes de type II et mineurs. Les stromélysines assurent le catabolisme des protéoglycanes en attaquant les parties protéiques de la molécule. Les agrécanases sont d'autres enzymes protéolytiques de structure proche des MMP également impliquées dans la dégradation des protéoglycanes. Enfin les gélatinases sont responsables de la dégradation du collagène dénaturé par les collagénases (fig 14).

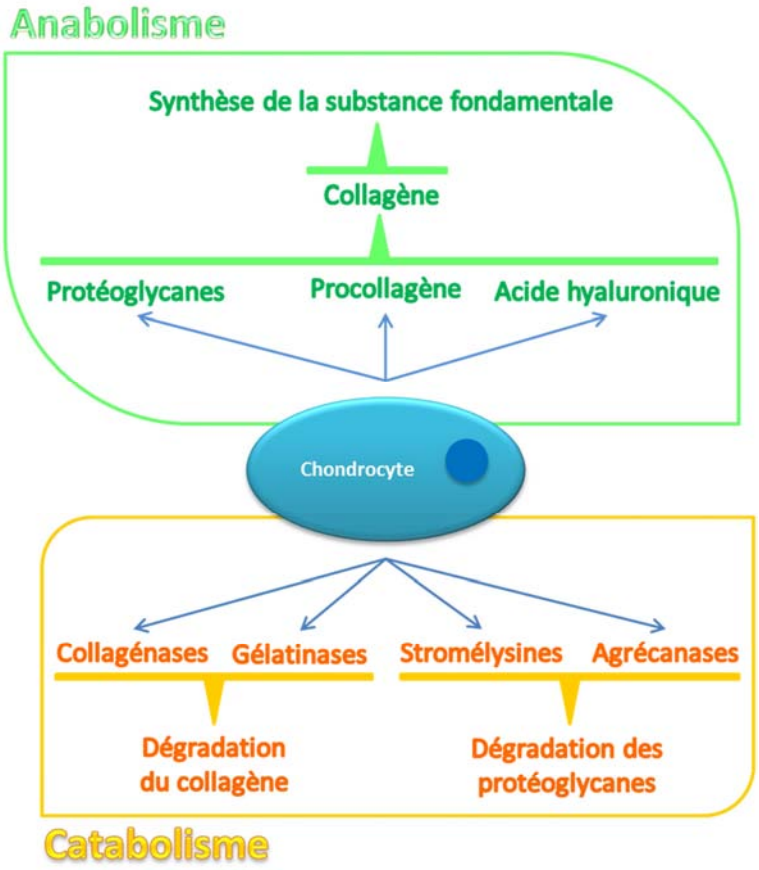



Figure 14 : schéma du rôle des différentes enzymes dans l'homéostasie articulaire [d'après (Fayolle, 2007)]

La concentration de ces enzymes dans le LS est proportionnelle à la gravité des lésions observées sur le cartilage arthrosique. Le rôle prépondérant de toutes ces métalloprotéinases dans la progression de l'arthrose en fait des cibles thérapeutiques très étudiées.

### 2. L'équilibre des cytokines (Demay, 2004) (Boire, 2012) (Fayolle, 2007)

Les cytokines sont des molécules qui permettent la communication entre les différentes cellules de l'organisme. Ce sont des molécules solubles également appelées facteurs de régulation peptidiques et qui sont à la base du système de communication intercellulaire au sein de l'organisme pluricellulaire. Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire (inférieur à 80 kDa) qui agissent par l'intermédiaire de leur fixation à des récepteurs cellulaires spécifiques portés à la surface des cellules cibles.

Les cytokines ont trois modes d'action : un effet endocrine avec une action sur des cellules distantes de leur lieu de production, mais elles peuvent également agir localement sur les cellules environnantes (effet paracrine) ou sur la cellule qui les a produites (effet autocrine). Après leur

interaction avec les récepteurs membranaires spécifiques, les cytokines modulent l'expression génique des cellules cibles en induisant un message intracellulaire.

Dans le cadre du fonctionnement articulaire qui nous intéresse ici, l'ensemble des évènements moléculaires impliqués dans la synthèse, l'assemblage et le renouvellement de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire nécessite un système de régulation méticuleux gouvernant les synthèses et les destructions de ses divers constituants. Ainsi, les macrophages synoviaux et les chondrocytes produisent des cytokines que l'on peut classer en trois types selon leur rôle spécifique :

- Cytokines anaboliques (IGF1, FGF, TGF-β, BMP, CDMP) qui favorisent la synthèse de la matrice extracellulaire cartilagineuse en augmentant la synthèse de protéoglycanes et autres constituants matriciels,
- Cytokines cataboliques (IL-1, IL-6, IL-17 et TNFα) qui favorisent la dégradation de la matrice extracellulaire cartilagineuse,
- Cytokines régulatrices (IL-4, IL-10, IL-13 et inhibiteurs de collagénases ou TIMPs) qui inhibent la production des cytokines cataboliques.

L'action de ces cytokines s'équilibre pour assurer l'homéostasie du cartilage sain (fig 15).

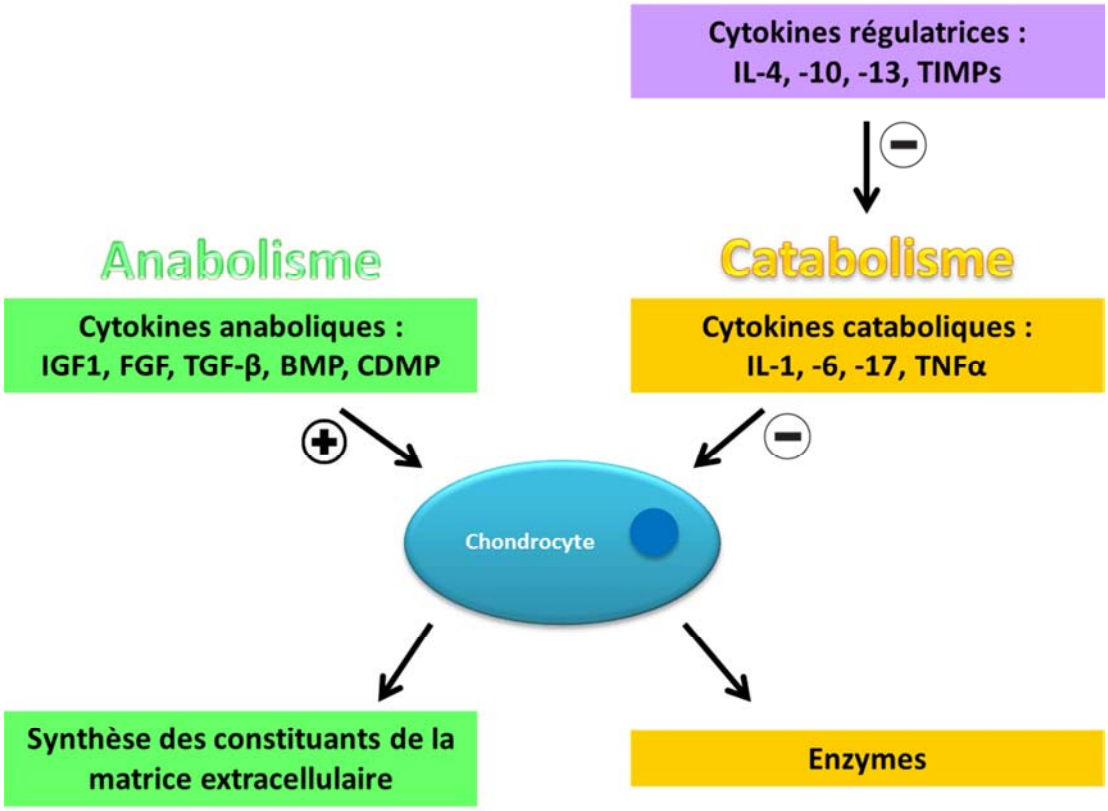



Figure 15 : schéma du rôle des différentes interleukines dans l'homéostasie articulaire [d'après (Boire, 2012)]

## II. L'ostéoarthrose, une maladie de l'organe diarthrose : rôle pathophysiologique complexe de l'inflammation

Comme nous venons de le voir, les différentes composantes de la diarthrose interagissent entre elles par le biais de cytokines et d'enzymes afin de maintenir l'homéostasie articulaire au sein d'un environnement soumis à des sollicitations mécaniques fréquentes et parfois intenses. Le cartilage est ainsi en permanence remodelé, conséquence de l'activité catabolique et anabolique de l'organe diarthrosique. Cependant, en cas d'arthrose, l'équilibre entre la synthèse de la matrice cartilagineuse et son turn-over est perturbé et abouti à la dégénérescence du cartilage (Boire, 2012). Face à cette constatation précoce, l'arthrose a longtemps été considérée comme une affection articulaire dégénérative affectant uniquement le cartilage (Berenbaum, 2013).

Bien que cela soit imparfait, on peut deux distinguer types d'arthrose (fig 16) (Fayolle, Qu'est ce que l'arthrose chez le chien et le chat, pourquoi ? Comment ?, 2007) :

- l'arthrose primaire ou « structurale » où une contrainte normale s'exerce sur un cartilage anormal dont la trame collagénique est déjà fragilisée,
- l'arthrose secondaire ou « mécanique » où un cartilage sain va subir des contraintes anormalement fortes.

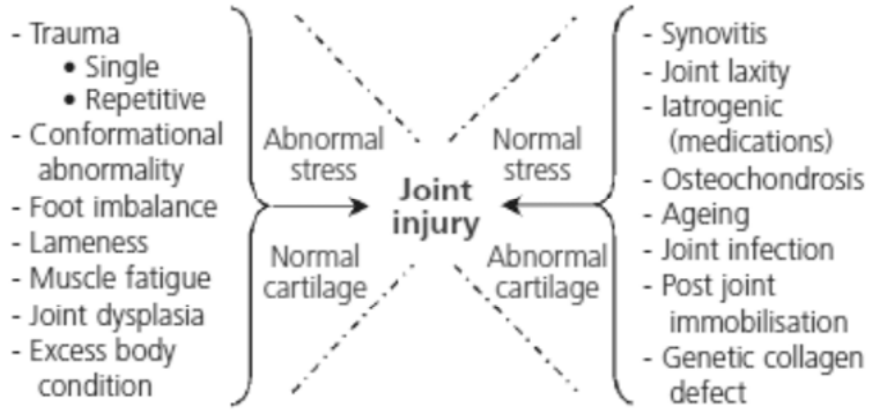



**Figure 16 : résumé des facteurs intra-/extra-articulaires prédisposant à la mise en place d'ostéoarthrose (Riggs, 2006)**

Ce paradigme était principalement fondé sur l'observation que les chondrocytes, seul type cellulaire présent dans le cartilage, ont une activité métabolique très faible sans possibilité de réparer le cartilage une fois que celui-ci est endommagé. De plus, contrairement à tous les autres tissus, le cartilage articulaire ne peut pas répondre à une agression par une réponse inflammatoire car il est non vascularisé et non innervé (Mobasheri, 2014).

Or, les progrès de la biologie moléculaire dans les années 1990 ont profondément bousculé ce modèle. En effet, la découverte de nombreux médiateurs solubles tels que les cytokines ou les prostaglandines pouvant augmenter la production de métalloprotéases par les chondrocytes conduit

aux premières étapes d'une théorie « inflammatoire ». Cependant, il faut près d'une décennie pour que la synovite soit considérée comme une caractéristique essentielle de l'arthrose. Aujourd'hui, certaines études suggèrent même que cette inflammation synoviale pourrait être le moteur du processus arthrosique. Des données expérimentales récentes montrent également que l'os sous-chondral pourrait avoir un rôle important dans le processus arthrosique en tant que source de médiateurs inflammatoires (Berenbaum, 2013) (Fahy, 2014).

Ainsi, initialement considérée comme une simple « usure » du cartilage, l'ostéoarthrose se révèle être une maladie beaucoup plus complexe, impliquant l'ensemble des composants articulaires et admettant une composante inflammatoire centrale (Berenbaum, 2013) (Robinson, 2009).

## A. Facteurs de risque chez les équidés

L'ostéoarthrose est un processus dynamique résultant d'une combinaison de facteurs liés à l'individu lui-même mais aussi à son activité, son alimentation et son environnement.

### 1. L'âge

Il est admis que la prévalence de l'ostéoarthrose augmente avec l'âge du cheval. En effet, au cours du vieillissement, la sénescence du cartilage entraîne des modifications structurelles des tissus articulaires et péri-articulaires qui altèrent les propriétés biomécaniques de l'organe diarthrosique. La sénescence du cartilage intervient principalement au niveau de la matrice extracellulaire et de la phase cellulaire (chondrocytes). Une dégradation enzymatique accrue des protéoglycanes et du collagène est à l'origine de la fragilisation de la matrice extracellulaire notamment dans sa couche superficielle. Ainsi, le cartilage articulaire est plus sensible aux contraintes physiologiques qu'il ne dissipe plus aussi bien et les chondrocytes subissent des contraintes anormalement élevées. La phase cellulaire subit quant à elle deux phénomènes : une réduction de la densité cellulaire ainsi qu'une prolifération et différenciation de cellules anormales (Lotz, 2012). Ces conditions biomécaniques défavorables pourraient expliquer le rôle joué par le vieillissement dans l'initiation et la progression des lésions du cartilage, bien qu'il soit difficile de distinguer l'ostéoarthrose du vieillissement physiologique de l'articulation car les deux phénomènes se traduisent par de la chondromalacie (Lejeune, 2006).

### 2. Le sexe

Dans l'espèce Humaine après 50 ans, la prévalence et la sévérité de l'arthrose sont supérieures chez les femmes ménopausées par rapport à l'homme. Cette constatation a conduit à la

formulation d'hypothèses sur le rôle des œstrogènes dans l'arthrose. Des chercheurs ont alors étudié l'augmentation de la sensibilité à la douleur lors de la ménopause du fait d'un déficit en œstrogènes, qui aurait pour effet de révéler une arthrose jusqu'alors silencieuse. Cependant, les résultats des études et des essais cliniques ont été contradictoires. Les disparités entre les sexes pourraient aussi être causées par des différences dans la solidité des os, l'alignement, la laxité ligamentaire, la grossesse et la force neuromusculaire. Les femmes peuvent également avoir un volume réduit de cartilage au niveau du genou, mais il n'est pas établit que cela puisse favoriser l'ostéoarthrose (Johnson, 2014) (Lejeune, 2006).

Chez le cheval, l'implication du sexe de l'individu dans l'apparition d'ostéoarthrose est variable selon les populations étudiées et les études réalisées. Il faut noter qu'il existe des biais apportés par la sélection faite en amont par les éleveurs. En effet, les meilleures femelles peuvent être écartées des terrains de compétition et donc des études, afin d'entamer une carrière de reproductrice. De plus, le cadre de la compétition en particulier dans les Courses, sectorise la participation des chevaux par classe d'âge et de sexe (Lejeune, 2006).

### 3. La race

La race est un facteur déterminant la prévalence et la localisation préférentielle des lésions ostéo-articulaires en général. A titre d'exemple, une étude comparative a montré une fréquence significativement plus élevée d'images radiologiques anormales au niveau du boulet postérieur chez les trotteurs français en comparaison avec les autres chevaux de sport. Les chevaux de selles français quant à eux présentent davantage de lésions au niveau du tarse proximal. Cependant, les populations étudiées sont des chevaux utilisés pour la compétition (Pur-sang, Trotteur, Cheval de Selle…), chacun d'entre eux pratiquant une discipline bien distincte (course de galop, course de trot, dressage, saut d'obstacles…) qui n'a pas les mêmes répercussions sur la fonction ostéoarticulaire. Ainsi on peut aussi considérer que l'implication de la race dans la prévalence de l'ostéoarthrose est intimement liée à l'activité pratiquée (Lejeune, 2006).

Néanmoins, des études chez le chien ont montré que pour un même degré de laxité articulaire, les chiens de race Setter Gordon ou Berger Picard vont développer plus facilement des lésions d'ostéoarthrose que des chiens de race Bouvier Bernois ou Rottweiler (Genevois, 2005). Chez le cheval, l'hérédité de l'ostéoarthrose serait plutôt liée à des maladies pouvant favoriser d'une façon ou d'une autre l'installation des lésions telles que l'ostéochondrose qu'on trouve plus souvent chez les chevaux de sport (type Demi-sang) que chez les Trotteurs et les Pur-Sang (Serres, 2013) (Boutrand, 1994).

### 4. Traumatisme et stress mécanique (Lejeune, 2006)

En médecine vétérinaire équine, les traumatismes et le stress mécanique sont deux facteurs marquants pouvant favoriser l'installation d'ostéoarthrose.

Effectivement, des dommages considérables peuvent être infligés au cartilage articulaire, que ce soit lors de fracture intra-articulaire ou lors de choc direct.

De plus, le stress mécanique répétitif est un facteur prédisposant tout aussi important sur des sujets de tout âge. Le cheval en tant qu'athlète subit des contraintes mécaniques de différentes amplitudes suivant les terrains pratiqués, le type d'exercice et son intensité (réception d'obstacle, travail sur deux pistes, endurance…). Ces contraintes mécaniques deviennent néfastes quand celles-ci sont d'une intensité trop importante, d'une durée trop longue ou d'une fréquence trop élevée. Les contraintes imposées sur les structures articulaires d'un quadrupède de plus de cinq cent kilogrammes sont fortes, ainsi la conformation originelle (aplombs) et le parage (et/ou ferrure) des pieds jouent un rôle essentiel dans la répartition des forces.

### 5. Le poids

Chez l'Homme, l'obésité est devenue un problème mondial de premier plan du fait de sa progression et des problèmes qu'elle engendre. Il existe des preuves considérables indiquant que l'obésité représente un des facteurs de risque les plus importants d'apparition d'arthrose. Ainsi être en surpoids favorise l'apparition de la maladie, mais augmente également le risque de progression des lésions (Johnson, 2014). Une étude récente (Jiang, 2012) montre que pour chaque augmentation de 5 unités de l'indice de masse corporelle (IMC), on associe une augmentation de 35% de risque d'arthrose du genou. A l'inverse, d'autres études [ (Felson, 1992) (Christensen, 2007)] ont montré qu'une réduction de poids de 5kg offre une diminution du risque de développement de l'arthrose du genou de 50%.

Chez le cheval, l'influence d'un poids excédentaire sur l'apparition d'ostéoarthrose reste encore hypothétique étant donné le peu d'études rapportées (Lejeune, 2006).

### 6. L'alimentation (Lejeune, 2006)

Le type d'alimentation des chevaux, principalement durant la croissance, a été étudié de manière récurrente quant à son influence sur les affections orthopédiques mais les liens avec l'affection orthopédique ne concernent pas directement l'ostéoarthrose bien que nous verrons

ultérieurement que n'importe quelle pathologie articulaire peut favoriser l'apparition d'ostéoarthrose. Plusieurs aspects sont envisagés parmi lesquels l'apport énergétique, le taux protéique et les équilibres minéraux des rations qui semblent jouer un rôle dans la formation de lésions au sein des cartilages de croissance. En effet, un excès d'énergie digestible, de phosphore, un rapport calcium/phosphore faible, une déficience en cuivre sont autant de facteurs fortement suspectés de favoriser les lésions d'ostéochondrose, une des pathologies orthopédiques du développement les plus représentées. Plus précisément, les excès de carbohydrates provoquant de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie postprandiale sont cités en tant que facteurs étiologiques éventuels de l'ostéochondrose. Notons que l'excès protéique n'est plus systématiquement associé à des maladies orthopédiques du développement depuis quelques années. Cependant, la notion d'acides aminés essentiels ou limitants est importante dans l'alimentation du poulain. La lysine et la thréonine sont les premiers acides aminés limitants pour la croissance chez le cheval.

## B. Physiopathologie de l'ostéoarthrose

Deux théories ont été établies pour tenter d'expliquer la pathogénie de l'ostéarthrose. Ces théories semblent être finalement davantage complémentaires qu'indépendantes.

### 1. Théorie mécanique

Cette théorie considère un cartilage sain soumis à des contraintes mécaniques anormales en fréquence, intensité ou en répartition des forces entrainant une rupture de la trame collagénique. Cette rupture entraîne d'une part une pénétration d'eau dans la matrice (chondromalacie) et d'autre part un défaut de contention des protéoglycanes. Il en résulte une fuite de protéoglycanes hors de la matrice cartilagineuse et donc une perte de l'élasticité du cartilage et de sa capacité à amortir les chocs (fig 17). Ce changement des propriétés biomécaniques du cartilage entraîne sa fissuration (Fayolle, 2007).

### 2. Théorie cellulaire

Cette théorie s'explique par un dysfonctionnement du chondrocyte considéré comme une cellule mécanosensible qui réagit lors de stress mécaniques répétés et intenses en modifiant son métabolisme (Fayolle, 2007). Lorsque le cartilage se détériore, l'orientation et l'intégrité du réseau de collagène constituant la surface du cartilage sont détruites. Les chondrocytes sont ainsi davantage exposés à des facteurs de croissance présents dans le LS et prolifèrent intensément en formant des

amas cellulaires nommés « clusters ». Les chondrocytes tentent alors de limiter les lésions et augmentent leur production de facteurs anabolisants tels que l'IGF-1 ou le TGF-β. Au contact de ces facteurs, les chondrocytes se dédifférencient et synthétisent du collagène principalement de type I ou III et des protéoglycanes parfois incomplètes (chaines de chondroïtine sulphate plus courtes). Ce fibrocartilage formé dans l'urgence est un cartilage non fonctionnel et plus fragile. En parallèle, les chondrocytes et les synoviocytes tentent de limiter l'inflammation en produisant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 (fig 17) (Demoor, 2014).

Cependant, l'anabolisme qui prédominait pendant un premier temps fini rapidement par s'incliner face au catabolisme. Effectivement, la dédifférenciation des chondrocytes et la dégradation de la matrice du cartilage deviennent irréversibles. Plusieurs enzymes cataboliques comme les métalloprotéinases et les agrécanases sont sécrétées par les chondrocytes et on observe une diminution de la sécrétion des inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMPs). Par ailleurs, des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et le TNF-α sont synthétisées et sont responsables de l'augmentation de la production et de l'activité de plusieurs métalloprotéinases (MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13, -17 et ADAMTS-4, -5) (fig 17) (Demoor, 2014).

La segmentation enzymatique des protéoglycanes et leurs modifications structurelles facilitent leur extraction hors de la matrice collagénique. Ceci diminue la force de résistance à l'écrasement et augmente la force de friction entre les surfaces articulaires par altération de la lubrification à l'origine de la fissuration.

### 3. Effet « domino » de la cascade inflammatoire

Suite à la fissuration, des fragments de cartilage sont libérés dans le LS ce qui génère une inflammation de la membrane synoviale entretenue par les chondrocytes et les synoviocytes. En effet, les synoviocytes de type A, stimulés par l'inflammation et les produits de dégradation de la matrice cartilagineuse, stimuleraient à leur tour les synoviocytes de type B et les chondrocytes via l'IL-1. Ces deux derniers types de cellules produiraient alors des cytokines, des médiateurs et des enzymes pro-inflammatoires qui agiraient de manière paracrine ou autocrine telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF-α ou la prostaglandine E2 (PGE2) via l'expression de la phospholipase A2 et la cyclooxygénase 2 (COX2) à partir des phospholipides membranaires (fig 17) (Demoor, 2014).

Ces médiateurs pro-inflammatoires augmentent la dégradation du cartilage et donc la libération d'éléments pro-inflammatoires. Ainsi on aboutit à un cercle vicieux de l'arthrose qui s'auto-entretient et s'auto-aggrave (fig 17).

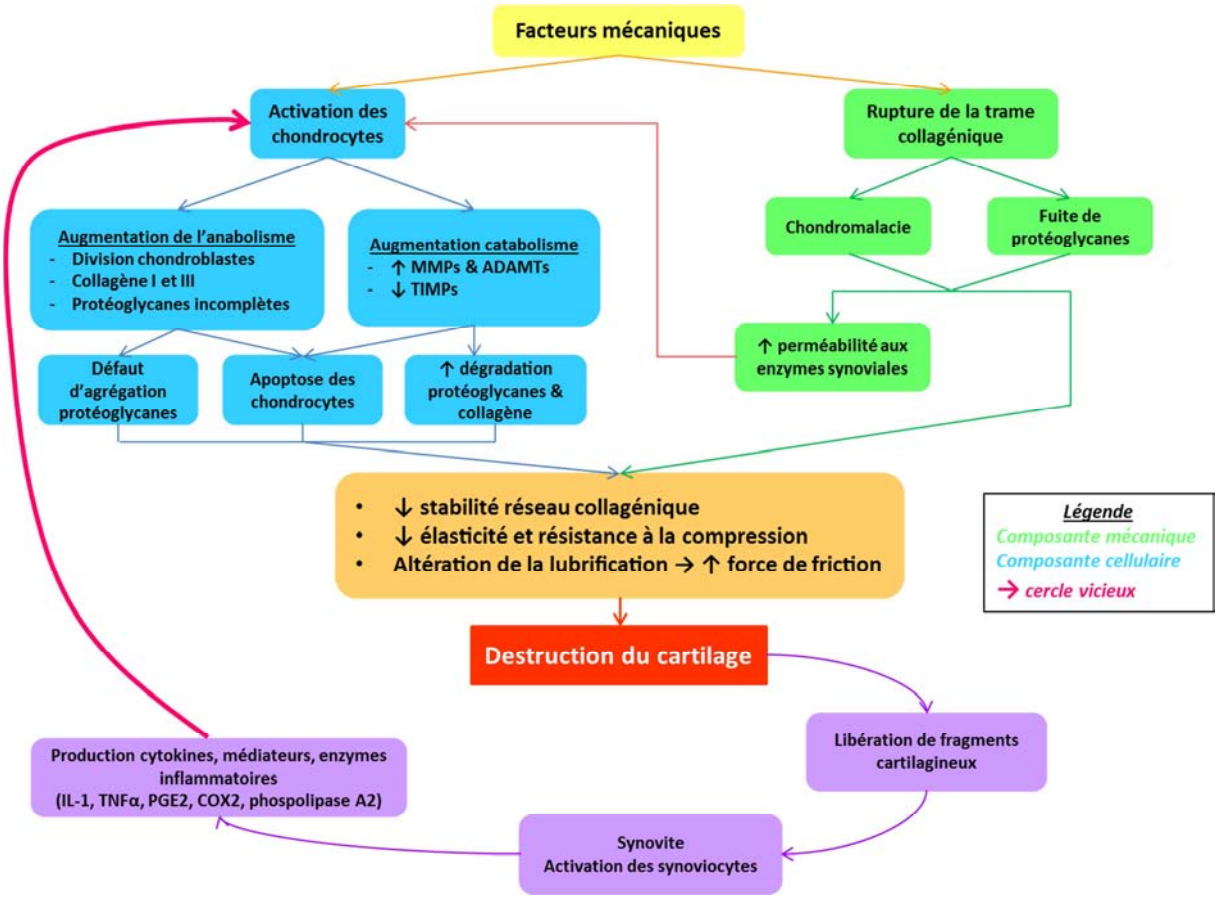



Figure 17 : résumé de la physiopathogénie de l'arthrose [d'après (Boire, 2012) (Demoor, 2014) (Fayolle, 2007)]

Le LS de patients atteints d'arthrose contient également des cellules du système immunitaire telles que les macrophages et les cellules T impliquées la stimulation de l'angiogenèse et qui participent donc à la pathogénie de l'ostéoarthrose. En effet, l'angiogenèse stimule l'ossification du cartilage articulaire et transporte des monocytes et des macrophages dans le synovium, ce qui favorise la formation d'ostéophytes et l'inflammation synoviales (Hsieh, 2013).

En outre, il existe une augmentation de la concentration sérique de protéine C-réactive (CRP) provoquée par l'infiltration de cytokines pro-inflammatoires dans le sang (Bennett, 2013).

## C. Le coût de l'ostéoarthrose

### 1. Un fardeau socio-économique

L'ostéoarthrose est la maladie articulaire la plus courante chez l'Homme et une des causes les plus importantes de douleur, d'invalidité et de pertes économiques (fig 18) (Loeser R. , 2010) (Anderson, 2011). En 2008, il a été estimé que près de 27 millions d'adultes aux États-Unis sont atteints d'ostéoarthrose clinique (contre 21 millions en 1995), soit environ 9% de la population des Etats-Unis (Helmick, 2008). La dégradation de la qualité de vie causée par l'ostéoarthrose a même

été comparée à celle causée par une maladie rénale en phase terminale ou un diabète sucré (Murillo, 2014).

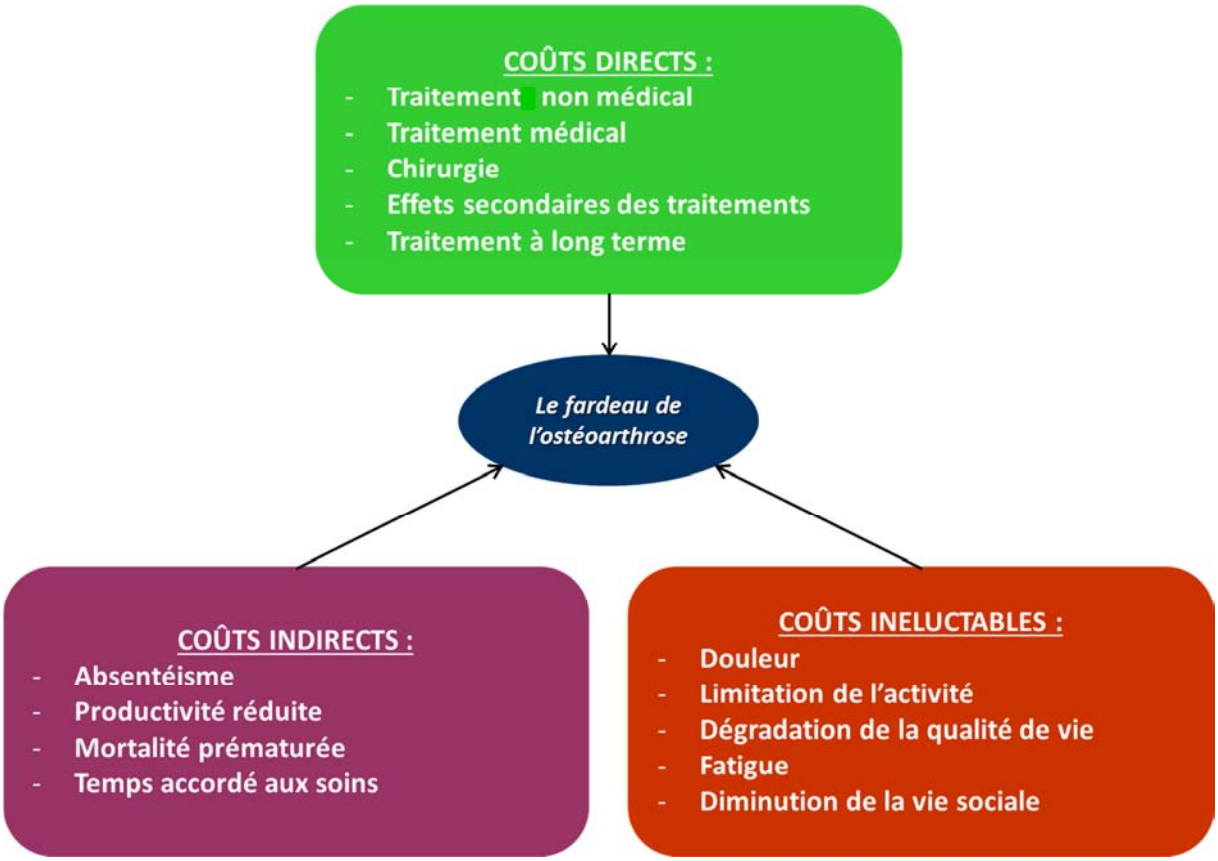



Figure 18 : le fardeau de l'ostéoarthrose [d'après (Hunter, 2014)]

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que l'ostéoarthrose (OA) se développe fréquemment sur des articulations ayant subi une lésion même de nombreuses années auparavant. En effet, une étude réalisée sur 1321 anciens étudiants en médecine a montré que 14% de ceux ayant subi une blessure au genou durant leur adolescence ou leur vie adulte ont développé de l'OA du genou, contre 6% chez ceux n'ayant jamais présenté de lésion (Gelber, 2000) (Weigel, 2002).

Dans l'espèce équine aussi l'OA revêt une importance particulière puisqu'elle représente une dominante pathologique de par sa forte prévalence et l'impact économique majeur qu'elle a sur l'industrie du cheval de sport (Bertone, 2014). Chez le cheval de course, l'articulation métacarpophalangienne est la plus fréquemment touchée par l'ostéoarthrose, juste devant les articulations du carpe (MCIlwraith, 2012).

Bien que divers types de traitement très variés contre l'OA existent et se développent, cette pathologie reste un challenge tant dans son dépistage que dans sa gestion ; sa résolution reste aujourd'hui encore impossible (Bertone, 2014). L'OA constitue ainsi un formidable enjeu de recherche pour comprendre encore davantage ses mécanismes physiopathologiques afin d'identifier

de nouvelles cibles thérapeutiques tant pour l'Homme que pour le cheval. En ce sens, le cheval constitue un très bon objet d'étude car chez cette espèce de grande taille, l'OA peut se développer spontanément et selon un modèle relativement prévisible et proche de l'OA humaine (Piel, 2014) (MCIlwraith, 2012) (Chiaradia, 2012).

## 2. Expression clinique et moyens diagnostics chez le cheval

### a. Une clinique incertaine et un diagnostic tardif

Cliniquement, l'ostéoarthrose se caractérise par une boiterie d'intensité variable, la présence d'un épanchement synovial, un gonflement des tissus mous périarticulaires et une réponse positive à la flexion de l'articulation atteinte (MCIlwraith, 2012). Cependant, bien que la douleur et la restriction de fonction qui en découle soient les premiers motifs de consultation, la corrélation est très mauvaise entre l'importance de la douleur ressentie et les lésions réellement observées (Chan K. S., 2014).

En effet, les symptômes vont dépendre de différents facteurs rendant le diagnostic clinique délicat (Tamba, 2005) :

- Le cheval : sa sensibilité propre à la douleur, le type d'activité pratiquée, ses commémoratifs ;
- La lésion : le ou les site(s) lésionnel(s), le stade de dégénérescence cartilagineuse, le stade inflammatoire de l'articulation ;
- Le clinicien : son expérience, son attention.

Il est donc impossible de déterminer un diagnostic de certitude d'ostéoarthrose ni de donner un pronostic par le seul examen clinique. On pratiquera donc des examens complémentaires, afin de déterminer les parts relatives des différentes composantes de l'arthrose et d'exclure toute autre cause de boiterie.

### b. La radiographie et ses imperfections

La radiographie est souvent le premier examen complémentaire choisi dans le diagnostic de l'ostéoarthrose car la majorité des vétérinaires y ont accès et elle offre également un bon rapport qualité diagnostique/prix (Daniel, 2012). Les principales caractéristiques radiologiques pouvant être observées au niveau de l'articulation atteinte d'ostéoarthrose comprennent la présence d'ostéophytes, une augmentation de la densité de l'os sous chondral (avec occasionnellement des

lésions de lyse ou des lésions kystiques) et la réduction de l'espace articulaire en phase terminale (fig 19 et 20) (MCIlwraith, 2012). Cependant, malgré les avancements technologiques permis par la radiographie numérique, la radiographie manque encore de sensibilité. Effectivement, les structures articulaires peuvent se superposer sur un cliché radiographique rendant son interprétation délicate. Autre exemple, pour qu'une diminution de densité osseuse soit clairement objectivable à la radiographie, il faut qu'elle atteigne 30 à 50% de la densité osseuse. Cela compromet une détection précoce des lésions d'ostéoarthrose (Daniel, 2012).

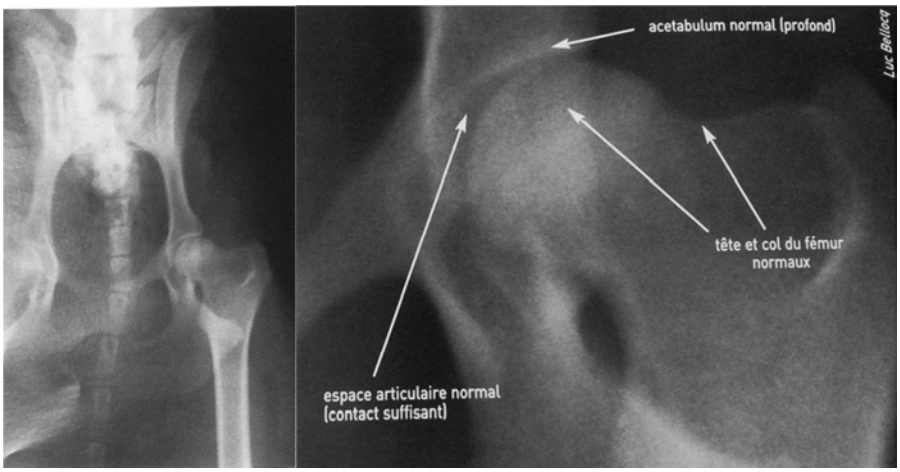



Figure 19 : radiographie d'une articulation coxo-fémorale de chien saine (Bellocq, 2007)

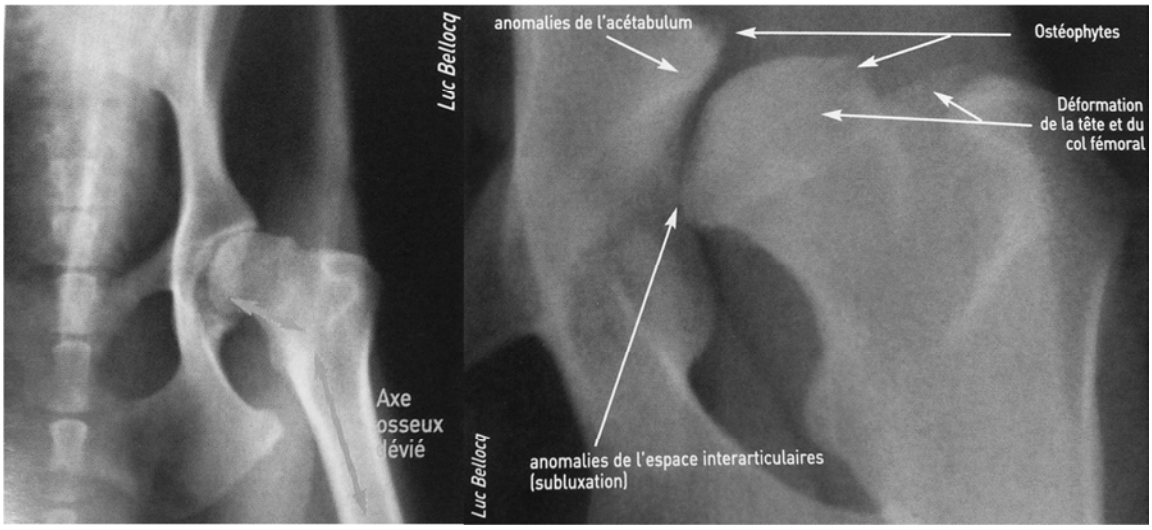



Figure 20 : radiographie d'une articulation coxo-fémorale de chien arthrosique (Bellocq, 2007)

### c. La scintigraphie

La scintigraphie est une autre modalité d'imagerie très sensible pour identifier une lésion osseuse sous-chondrale puisqu'elle met en évidence une augmentation du métabolisme des ostéoclastes et des ostéoblastes. Cependant, le principe même de la scintigraphie la rend peu

spécifique car l'os répond à la majorité des agressions en augmentant le métabolisme de ses cellules (Daniel, 2012) (Gaschen, 2012). Cette technique peut donc difficilement être utilisée seule.

### d. La performance de l'imagerie par résonance magnétique

Depuis une dizaine d'années, un autre outil d'imagerie diagnostique se développe : l'imagerie par résonance magnétique ou IRM. En effet, cet outil permet une analyse fine des structures de l'organe diarthrosique afin de proposer un diagnostic précoce d'ostéoarthrose. De ce fait, en plus d'offrir une bonne spécificité, l'IRM présente également une bonne sensibilité, bien meilleure qu'avec la radiographie (fig 21) (Daniel, 2012) (Ley, 2013). Cependant, même si cette technique non ionisante est en plein essor, peu de sites proposent actuellement ce service en France et le coût peut devenir prohibitif.

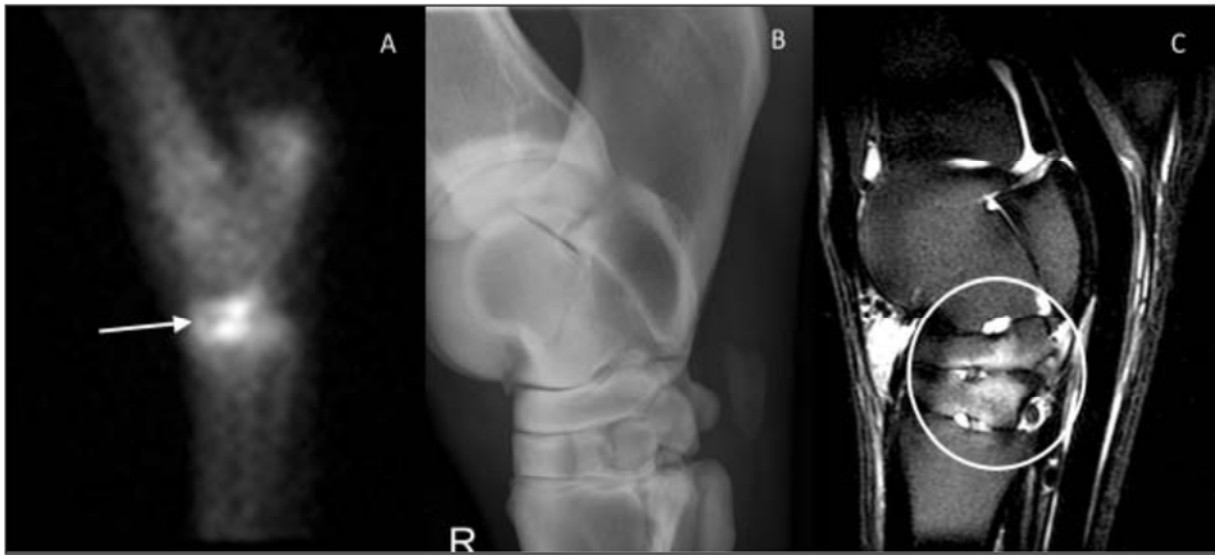



**Figure 21 : exemple de comparaison d'images sinctigraphique, radiographique et d'IRM (Daniel, 2012)**
*Images du tarse d'un hongre Warmblood de 9 ans présentant une boiterie chronique unilatérale d'un membre postérieur attribuée à la région du tarse. (A) Scintigraphie : plage anormale traduisant une augmentation du métabolisme osseux. (B) Radiographie : pas d'anomalie sur ce cliché. (C) IRM : lésions mises en évidence au niveau du tarse, image corroborant la scintigraphie.*

### e. L'échographie complémentaire

Dans plusieurs situations cliniques d'arthropathies, l'échographie s'illustre en tant qu'aide thérapeutique pour réaliser, par exemple, des injections intra-articulaires ou des biopsies. En ce qui concerne le diagnostic de l'ostéoarthrose, l'échographie joue un rôle complémentaire en tant que méthode rapidement disponible d'évaluation des ligaments, des tissus mous et des structures cartilagineuses. Elle peut également permettre d'évaluer la réaction inflammatoire ostéoarthrosique

(fig 22). Cependant, l'échographie ne permet pas d'étudier des structures profondes et possède une reproductibilité limitée selon le praticien et son expérience (Wick, 2014).

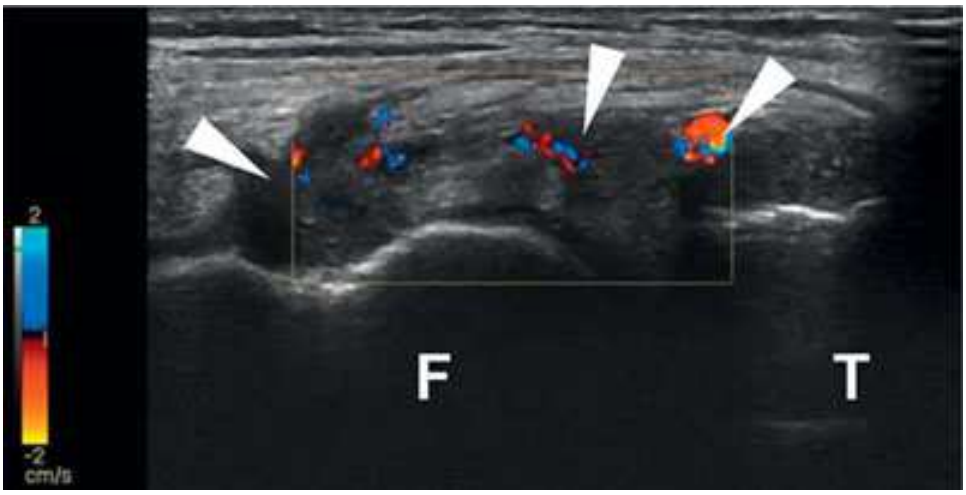



**Figure 22 : échographie Doppler du genou d'une femme de 71 ans souffrant d'ostéoarthrose, objectivation d'une synovite (Wick, 2014)**

### f. L'avenir dans le liquide synovial ?

Le prélèvement et l'analyse du LS de l'articulation suspectée atteinte peuvent également fournir un argument de plus pour le diagnostic d'ostéoarthrose. En effet, plusieurs marqueurs biologiques ont été évalués dans le LS sain et le LS pathologique. Par exemple, un LS sain contient moins de 2,5g/dL de protéines et moins de 1000 leucocytes. Alors qu'un LS inflammatoire verra ces paramètres augmenter fortement. Par ailleurs, il peut être intéressant de collecter un échantillon de LS avant de mettre en place un traitement de l'arthropathie. Ce LS pourra ainsi avoir une valeur de repère afin d'évaluer l'efficacité du traitement mis en place et/ou la progression de la pathologie (Robinson, 2009).

En outre, de nombreuses études récentes cherchent à évaluer les différentes molécules présentent dans le LS de patients atteints d'ostéoarthrose dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs pathologiques et de nouvelles cibles thérapeutiques (Balakrishnan, 2014), (Koskinen, 2014).

Comme nous venons de le voir, le diagnostic précoce de l'ostéoarthrose n'est pas aisé. Pourtant, afin de traiter de façon efficace, le diagnostic précoce est un préalable indispensable. Les différentes options de traitement qui s'offrent au praticien, bien qu'encore imparfaites, ne trouvent leur efficacité optimum qu'en présence d'une ostéoarthrose diagnostiquée précocement, situation encore peu courante (Robinson, 2009).

## III. Options de traitements de l'ostéoarthrose chez le cheval

Quelle que soit l'option de traitement choisie, un cheval atteint d'ostéoarthrose a tout d'abord besoin d'une activité sportive quotidienne adaptée et régulière. En effet, il est primordial de maintenir le cheval en bonne condition physique avec une bonne tonicité musculaire afin de prendre le relai de la (ou les) articulation(s) affectée(s). Pour cela, il est nécessaire de limiter l'usage de la longe ou les lâchers brutaux au pré et de préférer une détente longue (20 minutes minimum) sur des sols réguliers et plats avec une ferrure la plus simple et la plus légère possible (Launois, 2007). Au-delà de ces mesures dites « hygiéniques », de nombreux médicaments sont disponibles sur le marché pour la gestion de l'ostéoarthrose du cheval que ce soit par voie systémique ou par voie locale sous forme d'injection intra-articulaire. Tous doivent s'accompagner de repos et éventuellement d'une rééducation adaptés. Afin de contrer le processus dégénératif complexe de l'ostéoarthrose, le traitement idéal devra arrêter la cascade inflammatoire mise en jeu, supprimer la douleur associée et restaurer le cartilage dégradé en ayant le moins d'effets secondaires possibles. Malheureusement, aucune thérapeutique répondant à ces critères n'est pour l'instant disponible, mais des recherches actives se poursuivent et de nouvelles thérapies prometteuses commencent à se préciser (Caron J. , Therapy for equine joint disease. Large animal veterinary rounds, 2006).

### A. Traitement médical

#### 1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Goodrich, 2006) (Robinson, 2009) (Viel, 2006)

L'administration d'AINS trouve son origine il y a plus de 100 ans avec l'introduction de l'acide salicylique dans le traitement des maladies rhumatismales. Les AINS sont aujourd'hui parmi les molécules les plus couramment utilisées en raison de leurs propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Ils agissent en inhibant certaines enzymes permettant la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines et thromboxanes (fig 23), notamment la cyclo-oxygénase (COX). Toutes les cellules, y compris les chondrocytes et les synoviocytes possèdent de l'acide arachidonique au sein de leurs phospholipides membranaires.

Notons qu'il existe deux isoformes de la COX :

- La COX 1 qui est responsable des prostaglandines impliquées dans la régulation des fonctions gastrique et rénale et de l'homéostasie vasculaire.
- La COX 2 qui est principalement responsable de l'inflammation.

Ces deux types bien distincts de COX peuvent expliquer en partie la variabilité d'efficacité et la toxicité des AINS. En effet, les AINS inhibant la COX 1 peuvent provoquer chez le cheval des insuffisances rénales, des fourbures et des ulcérations du côlon dorsal notamment avec un effet additif entre les AINS. Ainsi, des AINS tels que l'aspirine, l'indométacine ou le piroxicam sont des inhibiteurs plus puissants de la COX 1 que de la COX 2 et présentent des effets secondaires délétères plus marqués. A l'inverse, des molécules telles que le meloxicam, le célécoxib ou le rofecoxib présentent une sélectivité pour la COX 2 ce qui limite leurs effets néfastes.

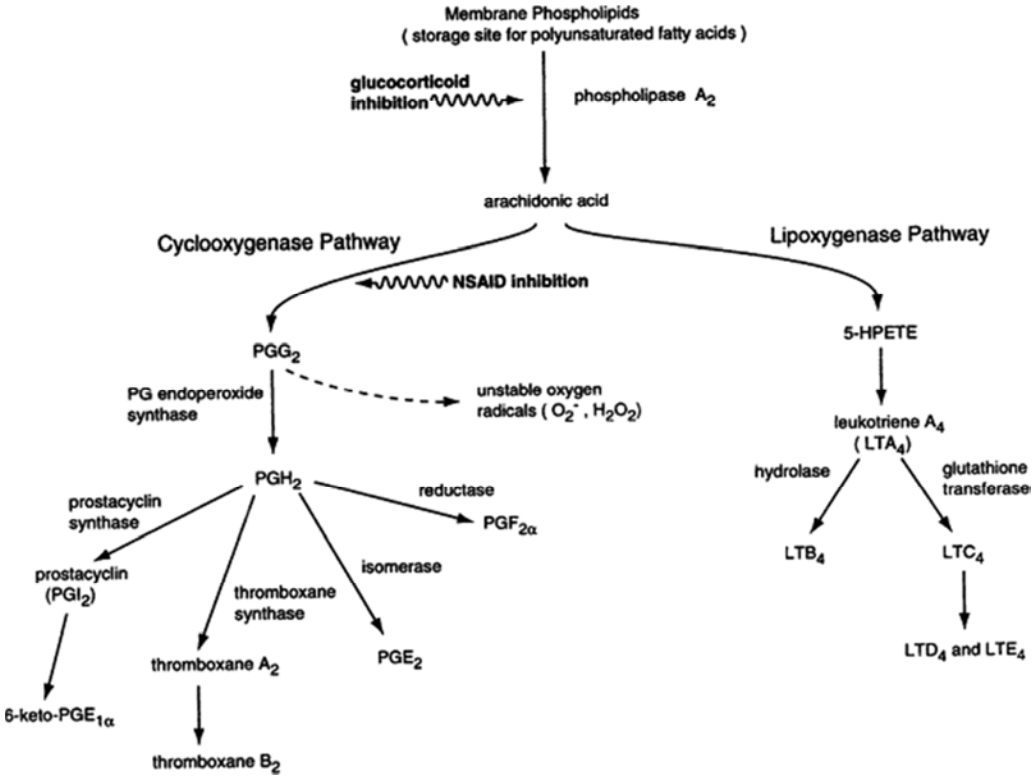



Figure 23 : la cascade de l'inflammation (McIlwraith C. T., 1996)

Les AINS les plus utilisés chez le cheval sont :

- la phénylbutazone dont l'efficacité sur les boiteries a, de manière surprenante, était peu étudiée compte-tenu de sa fréquence d'utilisation. Elle est principalement administrée per os avec ou sans dose de charge. Des doses supérieures à la recommandation peuvent entraîner une ulcération gastro-intestinale et buccale, une nécrose papillaire rénale et une thrombose vasculaire.
- la flunixine qui a un effet analgésique prolongé par rapport à la phénylbutazone mais présente un coût plus élevé. La dose quotidienne recommandée est de 1mg/kg et une toxicité apparaît lorsqu'on multiplie la dose recommandée par 5 ce qui en fait une molécule relativement sûre. La flunixine peut être administrée par voie orale ou intraveineuse. La voie

intramusculaire peut être envisagée mais plusieurs cas de nécrose musculaire ont été rapportés.

Chez le cheval de sport, le vétérinaire doit apporter un soin tout particulier à l'administration d'AINS, considérés comme produit dopant (tab II).

Tableau II : posologie et temps de détection des AINS chez le cheval [D'après (Fédération Equestre Internationale, 2013)]

| Substance | Préparation | Dose | Voie d'administration | Temps de détection (heures) | Estimation du prix du traitement pour un cheval de 500kg *(à titre indicatif)* |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Phenylbutazone*** | Equipalazone© (Dechra©) | 4,4mg/kg/5 jours/2x/jour ou 8,8mg/kg/2x/1 jour + 4,4mg/kg/2x/10 jours | Oral | 168 (7 jours) | 50€ |
| | Phenylarthrite© (Vetoquinol©) | 8,8mg/kg IV 2x/jour/5jours | Intraveineuse | 168 (7 jours) | 30€ |
| ***Flunixine*** | Meflosyl© (Zoetis©) | 1mg/kg IV 2x/jour/5jours | Intraveineuse | 144 (6 jours) | 80€ |

En conséquence, les AINS peuvent présenter un intérêt dans le traitement de l'ostéoarthrose en tant qu'anti-inflammatoires et analgésiques administrés per os ou par voie veineuse. Néanmoins, ils ne peuvent être utilisés que de manière ponctuelle, en respectant scrupuleusement leur posologie et en surveillant de près la survenue d'éventuels effets secondaires.

## 2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens par voie intra-articulaire

Les glucocorticoïdes inhibent la phospholipase A2 ce qui empêche l'hydrolyse des phospholipides membranaires et donc la mobilisation de l'acide arachidonique. De ce fait, la cascade inflammatoire est stoppée dès son commencement (fig 23) (Goodrich, 2006).

L'usage de la voie locale sous forme intra-articulaire permet de limiter la dilution au sein de l'organisme, d'obtenir une concentration élevée d'anti inflammatoire directement au sein de l'articulation lésée et de réduire les effets systémiques secondaires au médicament utilisé.

Les effets délétères rapportés suite à l'usage de corticostéroïdes sont un hypocorticisme iatrogène par inhibition de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et l'induction éventuelle d'une

fourbure en cas de surdosage. Il convient de préciser que le risque de fourbure associé aux injections intra-articulaires de corticostéroïdes a été étudié et décrit comme minimal aux doses recommandées (McCluskey, 2004). La voie intra-articulaire n'est toutefois pas dénuée de risque. Chez le cheval, tout comme chez l'Homme, des cas de synovite réactionnelle sévère suite à l'injection de corticostéroïdes (aussi appelée steroid flare) ont déjà été rapportés. Il convient également de tranquilliser correctement le cheval et de respecter une préparation chirurgicale soignée avant d'infiltrer l'articulation car celle-ci peut engendrer une arthrite septique si une bactérie est injectée de manière concomitante au corticostéroïde (Edwards, 2011). Toutefois, là-encore, l'incidence des infections suite à une injection intra-articulaire de glucocorticoïdes est faible (Goodrich, 2006).

Par ailleurs, l'effet des glucocorticoïdes sur l'organe diarthrosique ne fait pas consensus. Effectivement, il a été mis en évidence des effets délétères des anti-inflammatoires stéroïdiens sur le cartilage comme par exemple la diminution de taille et la nécrose des chondrocytes, ainsi que la diminution de la synthèse de glycosaminoglycanes (GAG). Cependant, d'autres études ont démontré tout à fait l'inverse en utilisant de plus faibles doses de corticoïdes pendant des temps d'exposition plus courts. De plus, d'autres chercheurs, en utilisant de petites doses d'hydrocortisone, ont montré une inhibition de la synthèse de métalloprotéinases par des chondrocytes humains issus d'articulations ostéoarthrosiques. La majorité des études récentes tendent tout de même à montrer qu'avec une utilisation raisonnée, les anti-inflammatoires stéroïdiens réduisent les concentrations de médiateurs inflammatoires au sein de l'environnement intra-articulaire et permettent ainsi une réduction de la douleur liée à l'ostéoarthrose (Goodrich, 2006) (Robinson, 2009).

De nombreux corticoïdes peuvent être injectés en intra-articulaire chez le cheval, le choix de la molécule repose sur son efficacité anti-inflammatoire, sa durée d'action, l'articulation à traiter et les effets secondaires associés. Ainsi, les corticostéroïdes les plus utilisés sont l'acétate de méthylprednisolone, l'acétonide de triamcinolone et la béthamethasone (tab III). L'acétonide de triamcinolone apparaît comme la molécule présentant le moins d'effets délétères sur le cartilage hyalin (Frisbie D. , 2012) (Robinson, 2009).

Tableau III : concentration, dose recommandée, temps de détection et informations générales sur les 3 principaux corticostéroïdes couramment utilisés par voie intra-articulaire chez le cheval [d'après (Caron J. , 2005) & (Goodrich, 2006) & (Fédération Equestre Internationale, 2013)]

| Corticostéroïde | Nom commercial | Fabricant | Concentration *(mg/mL)* | Dose *(mg)* | Durée d'action | Temps de détection (heures) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ACETONIDE DE TRIAMCINOLONE | Vetalog© | Solvay© | 6 | 6-18 | Moyenne | 168 (7 jours) |
| METHYLPREDNISOLONE | Depo-Medrol© | Upjohn© | 40 | 40-100 | Longue | 672 (28 jours) |
| BETHAMETHASONE | Celestone© Soluspan© | Schering-Plough© | 6 | 3-18 | Moyenne à longue | Non renseigné |

Idéalement, une seule injection intra-articulaire associée à 3 à 10 jours de repos devrait permettre de résoudre l'inflammation ostéoarthrosique. Cependant, l'amélioration clinique ne dure parfois que quelques jours et cela peut motiver une nouvelle injection. Néanmoins, il sera avant tout nécessaire d'envisager une exploration plus poussée des lésions et l'emploi d'autres types de traitement (Robinson, 2009). Là-encore, le praticien devra tenir compte des impératifs sportifs de son patient puisque les glucocorticoïdes sont également considérés comme produits dopants (tab III).

### 3. L'acide hyaluronique (Robinson, 2009) (Goodrich, 2006)

L'acide hyaluronique est un grand glycosaminoglycane non sulfaté et non ramifié composé d'unités de D-glucuronique et de N-acétyl glucosamine. Pour rappel, il est synthétisé par les synoviocytes de type B de la membrane synoviale et sert plusieurs fonctions fondamentales pour l'organe diarthrosique telles que :

- la viscoélasticité de la synovie et la lubrification intra-articulaire,
- la modulation de la réponse chimiotactique de la membrane synoviale par réduction de la migration des cellules et de son taux de perméabilité,
- la rigidité et la résistance à la compression du cartilage hyalin. En effet, l'acide hyaluronique constitue l'épine dorsale de l'ensemble des protéoglycanes dans la matrice extracellulaire.

Il est supposé que l'administration d'acide hyaluronique en intra-articulaire soutient, voire remplace, les actions de l'acide hyaluronique naturellement présent dans le LS, mais débilité dans un contexte d'ostéoarthrose. Le mécanisme d'action exact de l'acide hyaluronique au niveau cellulaire est pour l'instant inconnu. Des études récentes suggèrent que la réduction de la chimiotaxie et de la phagocytose des polynucléaires neutrophiles activés serait le fruit de l'interaction de l'acide hyaluronique avec le récepteur CD44 présent sur la membrane des neutrophiles. Quoi qu'il en soit, il

a été démontré que l'augmentation de la concentration en acide hyaluronique dans l'organe diarthrosique entraîne une réduction de synthèse des médiateurs de l'inflammation, une inhibition de la chimiotaxie des macrophages et une réduction de la prolifération et de la migration des lymphocytes.

Par ailleurs, l'influence du poids moléculaire de l'acide hyaluronique exogène à injecter ne fait pas consensus. Effectivement, il semble que l'acide hyaluronique de poids moléculaire supérieur à $10^5$ Daltons stimule la synthèse endogène d'acide hyaluronique alors que l'acide hyaluronique de poids moléculaire inférieur à $10^5$ Daltons n'aurait aucun effet sur cette synthèse et donc des bénéfices thérapeutiques limités. Cependant, d'autres études contredisent cette théorie et suggèrent que l'activité de l'acide hyaluronique serait médiée exclusivement pharmacologiquement et non pas physiquement.

Nonobstant, bien que les effets de l'acide hyaluronique sur l'organe diarthrosique soient encore incomplètement connus, l'impression clinique globale est favorable. Des chevaux atteints d'ostéoarthrose traités avec de l'acide hyaluronique ont présenté d'une part une réduction de leur boiterie et d'autre part, un amincissement et une fibrillation de surface de leur cartilage articulaire moins marqués. De ce fait, ces observations suggèrent qu'en plus d'agir sur l'inflammation ostéoarthrosique, l'acide hyaluronique pourrait avoir un effet chondroprotecteur.

Concernant l'administration d'acide hyaluronique, un intervalle d'une semaine entre les injections est recommandé pour une lésion aigüe, jusqu'à trois doses répétées. Cependant la posologie optimale est à pondérer en fonction de la gravité de l'ostéoarthrose et de la réponse au traitement. Notons que l'administration intra-articulaire d'acide hyaluronique est couramment concomitante avec l'injection d'un corticostéroïde ce qui est à prendre en compte dans l'adaptation de la posologie car le corticostéroïde aura une posologie prépondérante.

Pour terminer, l'acide hyaluronique peut également être injecté par voie intraveineuse. Cela permet par exemple de traiter plusieurs articulations ainsi que de limiter les risques liés à l'injection intra-articulaire. Les effets bénéfiques observés sont probablement le fait d'une localisation de l'acide hyaluronique dans la membrane synoviale puisque la demi-vie plasmatique de la molécule ne dépasse pas 5 minutes. La membrane synoviale étant en outre, très vascularisée, l'administration intraveineuse pourrait permettre une plus grande exposition des synoviocytes par rapport à l'injection intra-articulaire. Une étude (Goodrich, 2006) a montré qu'après une injection intraveineuse d'acide hyaluronique, on observait une réduction du taux de prostaglandines dans les articulations concernées. Fait intéressant, aucun effet sur l'acide hyaluronique endogène ou sur la morphologie du cartilage n'a été noté. Cette étude suggère donc que l'acide hyaluronique pourrait

avoir des effets anti-inflammatoires prépondérants dans son action sur l'articulation ostéoarthrosique.

### 4. Glycosaminoglycanes polysulfatés (PSGAGs)

L'Adequan© est le seul PSGAG approuvé pour une utilisation dans le traitement de l'ostéoarthrose aux Etats-Unis. Il est produit à partir d'une source animale, principalement du cartilage de trachée bovine. Le pentosane polysulfaté appartient à la même classe de médicaments mais il est produit à partir d'une source végétale (Goodrich, 2006). Les PSGAGs maintiennent l'activité métabolique des chondrocytes, protègent le cartilage des effets néfastes des cytokines et prostaglandines et inhibent l'inflammation dans le LS. Pourtant, leur mécanisme d'action cellulaire reste inconnu (Goodrich, 2006).

L'Adequan© est communément administré par voie intra-articulaire, mais il est également possible de l'injecter par voie intramusculaire bien que moins de données existent concernant son efficacité par cette deuxième voie (Goodrich, 2006). La posologie recommandée chez le cheval est de 500mg deux fois la première semaine, puis 500mg une fois par semaine pendant deux à quatre semaines, puis 500mg ponctuellement au besoin en cas d'arthrose avancée (Robinson, 2009). Toutefois, il faut savoir que l'injection intra-articulaire de PSGAGs est associée à une immunosuppression locale marquée ayant parfois provoqué des complications dévastatrices. Effectivement les PSGAGs sembleraient inhiber l'activité du complément au sein de l'articulation. Cette constatation a entraîné, malgré le manque de données cliniques, une utilisation intramusculaire plus large de l'Adequan© qui vient souvent compléter une injection intra-articulaire unique (Robinson, 2009) (Goodrich, 2006).

### 5. Glucosamine et chondroïtine sulfate par voie orale (Goodrich, 2006)

Les compléments alimentaires vendus en tant que traitement de fond contre l'ostéoarthrose contiennent généralement des composants moléculaires du cartilage et des précurseurs tels que la chondroïtine sulfate et du chlorhydrate de glucosamine. Ces agents sembleraient lutter contre le stress qui s'exerce sur le cartilage hyalin lors d'ostéoarthrose en améliorant la réponse anabolique chondrocytaire.

Le glucosamine est un monosaccharide aminé dérivé de la chitine des coquilles de crustacés. La chondroïtine sulfate est un polymère à longue chaîne de disaccharides contenant du sulfate de

galactosamine et de l'acide glucuronique contenus dans la majorité des GAG du cartilage hyalin. La chondroïtine sulfate est le plus souvent isolée à partir de trachées bovines et de cloisons nasales bovines ou d'autres sources naturelles (squelettes de requins). Son efficacité symptomatique est démontrée chez l'Homme mais peu d'études existent chez le cheval. Les mécanismes d'action du glucosamine et de la chondroïtine sulfate ne sont pas clairement élucidés. Ils semblent cependant remplir plusieurs rôles tels que fournir un substrat disponible pour la matrice cartilagineuse, stimuler la synthèse des GAG, du collagène et avoir un effet anti-inflammatoire notamment par inhibition des MMPs et de l'IL-1β.

La combinaison glucosamine et chondroïtine sulfate a été intensément étudiée et les deux protagonistes semblent présenter une synergie. Effectivement, leurs effets chondroprotecteurs seraient beaucoup plus grands combinés étant donné que la production des GAG est essentiellement stimulée par la glucosamine et la dégradation de la matrice est particulièrement inhibée par la chondroïtine sulfate.

En ce qui concerne l'absorption et la biodisponibilité, le glucosamine est une substance endogène rapidement utilisée par l'organisme. La chondroïtine sulfate est une grosse molécule dont le poids moléculaire semblerait rendre difficile son absorption par la muqueuse digestive. Pourtant, des produits de dégradation ont été détectés dans le plasma, ce qui suggère une absorption efficace.

Le peu d'études existantes concernant l'évaluation de l'efficacité du glucosamine et de la chondroïtine sulfate chez le cheval tendent à démontrer une amélioration clinique et un développement moins rapide de l'ostéoarthrose. Dans la majorité des études, c'est le Cosequin© de Nutramax© qui a été utilisé. Effectivement, il y a beaucoup de produits actuellement disponibles censés contenir du glucosamine et de la chondroïtine sulfate. Toutefois, un article d'Abedowale *et al*. (2000) révèle que 84% des produits testés ne répondaient pas à leur étiquette avec de contrôles allant de 0 à 115% de l'intitulé. Par conséquent, les produits non utilisés dans des essais cliniques doivent être examinés avec soin.

### 6. Le tiludronate par voie intraveineuse

L'acide tiludronique est un bisphosphonate dépourvu d'azote utilisé dans le traitement de troubles du squelette caractérisés par un remodelage osseux accru et anormal telle que la maladie de Paget chez l'Homme. Le tiludronate par voie intraveineuse a été à l'origine employé chez le cheval de plus de 3 ans en tant qu'aide au traitement des boiteries associées à l'éparvin et au syndrome naviculaire. Il est actuellement le seul bisphosphonate validé par voie intraveineuse chez le cheval

pour soulager les signes cliniques d'ostéoarthrose (Moreau, 2011). Notons qu'une étude récente sur des explants de cartilage équins (Duesterdieck-Zellmer, 2012) a montré que de faibles concentrations de tiludronate ont des effets chondroprotecteurs alors que des concentrations élevées provoquent des lésions cartilagineuses. Des études *in vivo* seront donc nécessaires avant d'envisager une injection intra-articulaire d'acide tiludronique.

Bien que plusieurs études montrent un effet positif de l'administration de tiludronate sur les symptômes de l'ostéoarthrose tout en étant associé à un ralentissement du développement de la pathologie, une préservation de l'intégrité du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral ainsi qu'une réduction de la synthèse des médiateurs inflammatoires, les mécanismes mis en jeu demeurent inconnus (Pelletier, 2011) (Moreau, 2011).

Le tiludronate s'administre par voie intraveineuse chez le cheval à la posologie de 1mg/kg. Cette administration peut se faire en une fois en perfusion lente sur trente minutes ou par 1 injection par jour pendant dix jours, chaque injection se faisant à la posologie de 0,1mg/kg. Il n'y a pas de différence d'efficacité entre les deux modes d'administration. Pour une administration en perfusion lente, il faut diluer le tiludronate dans une solution de 1L de chlorure de sodium à 0,9%. Les solutés contenants des ions divalents comme le Ringer Lactate sont à éviter en raison du risque de réaction entre ceux-ci et le tiludronate. Il est important de réaliser cette perfusion lentement car il y a une possibilité de formation de complexes ou d'agrégats avec le calcium ou les ions divalents sanguins pouvant induire une hypocalcémie et une insuffisance rénale. Pour une administration par injection intraveineuse quotidienne pendant 10 jours, il faut mettre en solution le tiludronate sous forme de poudre lyophilisée à l'aide de 10mL d'eau pour préparations injectables fournie avec les dix flacons de poudre, chaque flacon de poudre contenant 50mg de tiludronate (Poircuitte, 2004).

### B. Traitement chirurgical

Le traitement chirurgical de l'ostéoarthrose intervient après échec d'un traitement médical et n'est pas courant chez le cheval.

Tout d'abord, une arthroscopie pourra être envisagée dans le but d'explorer plus finement les lésions ou d'effectuer un lavage articulaire qui permettra d'éliminer les médiateurs inflammatoire délétères. De plus, certaines lésions cartilagineuses, osseuses et des tissus mous pourront être débridées sous guidage arthroscopique (Robinson, 2009). Après une chirurgie par arthroscopie, il faut créer au maximum un environnement permettant de réduire l'inflammation articulaire. De ce fait, la stabilité de l'articulation et la réduction des mouvements afin d'éviter tout traumatisme

articulaire seront de mise afin de réduire les risques de rupture des tissus fragiles nouvellement formés. L'administration d'AINS pendant 3 à 5 jours est recommandée (Caron J. G., 2008).

Par ailleurs, lorsque l'ostéoarthrose est très avancée, avec des lésions sévères, l'arthrodèse peut être envisagée. Cette technique vise à bloquer l'articulation atteinte par l'obtention d'une fusion osseuse. Puisqu'il n'y a plus d'articulation, il n'y a plus ni inflammation ni douleur (Robinson, 2009). Cette arthrodèse peut être créée par fixation interne, coaptation externe ou en utilisant des agents chimiques (Caron J. G., 2008).

## C. Technologies médicales

### 1. Les ondes de choc

En orthopédie, les ondes de choc sont utilisées depuis une vingtaine d'années chez l'Homme et chez l'animal pour traiter les pathologies tendineuses (Chen, 2014). Depuis quelques années, on applique également les ondes de choc à la gestion de l'ostéoarthrose car c'est une technique non invasive et dépourvue d'effets secondaires (Revenaugh, 2005).

Une onde de choc est une onde acoustique à impulsion unique générée par une source électromagnétique, électrohydraulique ou piézoélectrique. Selon l'énergie délivrée en millijoules par millimètre carré ($mJ/mm^2$), on distingue 3 types d'ondes de choc (Chen, 2014):

- les ondes de faible énergie qui sont des ondes de choc extracorporelles dont la densité de flux énergétique est inférieure à 0,08 $mJ/mm^2$ ;
- les ondes d'énergie moyenne qui sont des ondes de choc dont la densité de flux énergétique est comprise entre 0,08m $J/mm^2$ et 0,28 $mJ/mm^2$ ;
- les ondes de haute énergie qui sont des ondes de choc dont la densité de flux énergétique est comprise entre 0,28 $mJ/mm^2$ et 0,60 $mJ/mm^2$.

Des études récentes chez le lapin (Wang, 2014) (Zhao, 2012) montrent que les ondes de choc pourraient freiner la progression de l'ostéoarthrose en diminuant l'apoptose des chondrocytes, en agissant sur les MMP-1, MMP-3 et TIMP-1 au niveau du cartilage et en modulant le métabolisme de l'os sous-chondral. Nonobstant, le mécanisme précis reste encore à explorer notamment chez le cheval et a pour conséquence une utilisation empirique des machines à onde de choc avec des protocoles de réalisation très hétérogènes (Revenaugh, 2005).

## 2. Protéine antagoniste du récepteur à l'interleukine 1 (IRAP ou IL1Ra)

L'IRAP équin est une protéine de 21kDaltons présentant 76% d'homologie avec l'IRAP humaine. Elle est produite majoritairement par les monocytes mais aussi par les kératinocytes, les chondrocytes, les synoviocytes et les polynucléaires neutrophiles. Toutes ces cellules synthétisent simultanément l'IRAP et l'IL-1 (Textor, 2011). Comme décrit précédemment, l'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire d'une importance particulière dans le processus ostéoarthrosique (fig 24). Ainsi, il a été démontré *in vivo* chez l'animal que l'IRAP, inhibiteur naturel de l'IL-1, modifiait positivement le processus pathologique de l'ostéoarthrose (Baltzer, 2013).

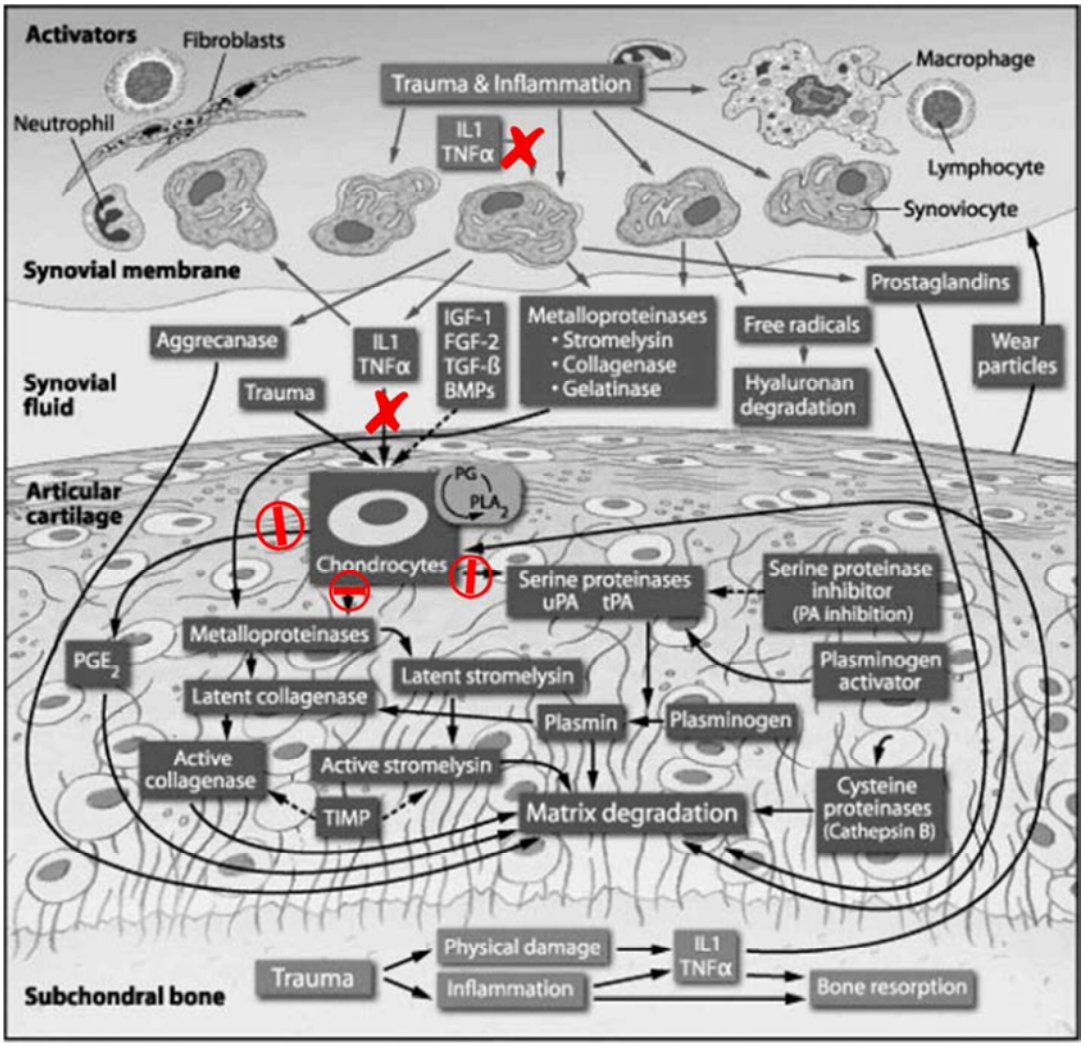



Figure 24 : rappel de l'impact de la rupture du cycle de l'inflammation par action sur l'IL-1 [d'après (McIlwraith, 2010)]

L'IL1Ra se fixe de manière compétitive aux récepteurs à l'IL-1 (Bresnihan, 1998). Chaque cellule possédant ce récepteur en porte des milliers à sa surface. Pourtant, la fixation de seulement quelques IL-1 est suffisante pour induire une réponse de la part de la cellule. Ainsi, l'affinité de l'IL-1 et de l'IRAP pour le récepteur à l'IL-1 étant considéré comme équivalente, seule la différence de concentration entre IRAP et IL-1 influence la qualité de la réponse au traitement (Textor, 2011).

L'IRAP est préparé à partir d'environ 50 millilitres de sang veineux total récoltés stérilement dans une seringue spéciale et incubés 24h à 37°C. La seringue contient des billes de verre qui permettraient l'activation des monocytes sanguins. Au terme des 24h d'incubation, la seringue est centrifugée 10 minutes à 2500-3100G. Le sérum obtenu contient des niveaux élevés de diverses cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL1Ra, l'IL-4 et l'IL-10. Il passe ensuite par un filtre stérile monté sur la seringue lors de son transfert en aliquotes de 2mL en moyenne. Les seringues aliquotes sont alors directement injectées ou congelées à -20°C avant utilisation (Baltzer, 2013) (Textor, 2011).

L'IRAP ainsi préparé est injecté en intra-articulaire (tab IV).

**Tableau IV : protocoles de base dans le traitement de l'ostéoarthrose pour différentes articulations du cheval (Weinberger, 2008)**

| Articulation | Volume à injecter (mL) | Intervalle entre deux injections (jours) |
|---|---|---|
| Articulation interphalangienne distale | 4-6 | 8-14 |
| Articulation interphalangienne proximale | 2-4 | 8-14 |
| Articulation métacarpo-phalangienne | 4-6 | 8-14 |
| Carpe | 2-4 | 8-14 |
| Articulation tarso-métatarsienne | 1-2 | 8-14 |
| Tarse | 6-8 | 8-14 |
| Hanche | 4-8 | 12-21 |

Le résultat positif d'une étude portant sur des chevaux atteints d'osteoarthrose (Frisbie D.D., 2007) a tempéré le scepticisme initial concernant cette technique. Effectivement, l'injection intra-articulaire d'IRAP a été à l'origine d'une amélioration clinique significative de la boiterie, d'une diminution significative de l'hyperplasie de la membrane synoviale, et d'une réduction de la fibrillation de la surface du cartilage. Des études prospectives, randomisées et en double aveugle chez l'Homme, ont par ailleurs démontré que l'IRAP est plus efficace qu'un placebo ou que l'acide hyaluronique dans le traitement de l'ostéoarthrose du genou (Baltzer A.W., 2009) (Yang K.G., 2008).

### 3. Le concentré plaquettaire ou PRP

Le PRP constitue une autre approche de dérivés sanguins optimisés pour le traitement de l'arthrose. En effet, le PRP est un concentré de sang autologue contenant un nombre élevé de plaquettes (Mangone, 2014). Il existe trois types de concentré plaquettaire utilisés en médecine régénérative (Giraldo, 2013) :

- Le plasma riche en plaquette pur (P-PRP) qui contient 1,3 à 4 fois plus de plaquettes et 0,5 à 2 fois plus de leucocytes que le sang total ;
- Le plasma riche en plaquettes et en leucocytes (L-PRP) qui contient 5 fois plus de plaquettes et 3 fois plus de leucocytes que le sang total ;
- La fibrine riche en plaquette (PRF) obtenue à partir de sang sans anticoagulant.

Les plaquettes contenues dans le PRP interviendraient principalement *via* leurs facteurs de croissance contenus dans leurs granules alpha (fig 25) (Kon, 2013) (Giraldo, 2013). En effet, l'influence des facteurs de croissance sur la réparation du cartilage a été étudiée *in vitro* et *in vivo* et le PRP constitue une méthode simple et peu invasive pour fournir un concentré naturel de facteurs de croissance (Filardo, 2012). La libération de ces facteurs de croissance serait corrélée à l'activation des plaquettes. Par ailleurs, la race, le sexe et l'âge de l'animal influenceraient le profil des facteurs de croissance libérés ainsi que la composition cellulaire du PRP (Giraldo, 2013). La congélation du PRP nuirait également à la libération des facteurs de croissance par les thrombocytes (Kon, 2013).

| Growth Factor | Effect | PRP Concentration (SD) |
|---|---|---|
| PDGF | Macrophage activation and angiogenesis<br>Fibroblast chemotaxis and proliferative activity<br>Enhances collagen synthesis<br>Enhances the proliferation of bone cells | $\alpha\beta$ 117.5 ng/mL (63.4)<br>$\beta\beta$ 9.9 ng/mL (7.5) |
| TGF$\beta$ | Enhances the proliferative activity of fibroblasts<br>Stimulates biosynthesis of type I collagen and fibronectin<br>Induces deposition of bone matrix<br>Inhibits osteoclast formation and bone resorption | $\beta$1: 169.9 ng/mL (84.5)<br>$\beta$2: 0.4 ng/mL (0.3) |
| IGF-I | Chemotactic for fibroblasts and stimulates protein synthesis<br>Enhances bone formation by proliferation and differentiation of osteoblasts | 84.2 ng/mL (23.6) |
| PDEGF | Promotes wound healing by stimulating the proliferation of keratinocytes and dermal fibroblasts | 470 pg/mL (320) |
| PDAF | Induces vascularization by stimulating vascular endothelial cells | |
| PF-4 | Stimulates the initial influx of neutrophils into wounds<br>A chemoattractant for fibroblasts<br>A potent antiheparin agent | 0.189 nmol/mL (0.07) |
| EGF | Cellular proliferation<br>Differentiation of epithelial cells | 51 pmol/L (5) |
| VEGF | Angiogenesis<br>Migration and mitosis of endothelial cells<br>Creation of blood vessel lumen<br>Creates fenestrations<br>Chemotactic for macrophages and granulocytes<br>Vasodilation (indirectly by release of nitrous oxide) | 76-854 pg/mL |

**Abbreviations:** PDGF, platelet-derived growth factor; TGF, transforming growth factor; IGF, insulin-like growth factor; PDEGF, platelet-derived endothelial growth factor; PDAF, platelet-derived angiogenesis factor; PF-4, platelet factor 4; EGF, endothelial growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. Reprinted with permission.[57]

**Figure 25 : rôle des facteurs de croissance produits par les plaquettes et concentration moyenne dans le PRP chez l'Homme (Wroblewski, 2010)**

Grâce à ces facteurs de croissance, les plaquettes participeraient au processus de guérison ostéoarthrosique en favorisant la prolifération des chondrocytes, la migration cellulaire, et la synthèse de la matrice extracellulaire cartilagineuse. En outre, le PRP en limitant l'inflammation initiale, réduirait la prolifération des macrophages mais aussi l'expression de COX-2. De plus, le PRP

aurait la capacité de stimuler les cellules stromales quiescentes afin qu'elles se différencient en cellules nécessaires à la reconstruction du cartilage ostéoarthrosique. Des études récentes montrent également que les thrombocytes réduiraient la douleur liée à l'ostéoarthrose par l'activation d'un de leurs récepteurs aux propriétés antinociceptives. En résumé, le PRP offrirait la possibilité de réparer les dommages du cartilage articulaire, de prévenir sa dégradation, de réduire la douleur ostéoarthrosique et d'améliorer la fonctionnalité de l'articulation (Mangone, 2014).

Le PRP est obtenu à partir de sang total autologue, soit par centrifugation en série permettant de concentrer un maximum de plaquettes au sein d'un volume minimal de plasma, soit par aphérèse en utilisant un séparateur de cellules (Mangone, 2014). Ces deux méthodes comportent un grand nombre de variables et il n'existe actuellement pas de consensus quant à la préparation du PRP ce qui rend difficile l'établissement d'une définition étendue de la technique. Le concentré plaquettaire obtenu par l'une ou l'autre des méthodes peut être utilisé directement en intra-articulaire ou activé préalablement ce qui favoriserait la libération des facteurs de croissance par les plaquettes. Le chlorure de calcium et la thrombine sont deux activateurs couramment utilisés bien que leurs effets soient encore controversés (Kon, 2013).

Enfin, des études récentes (Filardo, 2012) (Cerza, 2012) ont mis en évidence une efficacité supérieure du PRP par rapport à l'acide hyaluronique dans le traitement de l'ostéoarthrose. Cependant, puisqu'aucune définition ni aucun protocole d'administration du PRP ne sont actuellement établis et que peu d'études randomisées prouvent son efficacité, on ne peut pas encore considérer le PRP comme un traitement de première ligne contre l'ostéoarthrose. Néanmoins, l'aspect qui semble avoir suffisamment de preuves scientifiques est l'innocuité de la technique. Effectivement, tout comme l'IRAP, les nouveaux traitements issus directement du propre sang de l'animal attirent en raison de la réduction théorique des risques d'intolérance et d'effets secondaires contrairement aux traitements traditionnels. Il reste pourtant du chemin à parcourir pour caractériser et préciser ces nouvelles techniques ainsi que leur efficacité dans le traitement de l'ostéoarthrose (Kon, 2013).

### 4. Vers une médecine personnalisée ?

Une grande partie de la médecine traditionnelle est fondée sur une approche de santé publique dont les résultats obtenus sur une large population sont utilisés pour déterminer des recommandations pour chaque individu (Sawitzke, 2013). Or, il est admis que pour un traitement donné, certains patients vont être réceptifs, d'autres ne le seront pas, et d'autres pourront présenter des effets secondaires. La médecine personnalisée a donc pour objectif de proposer le bon

traitement au bon patient. Dans le cas de l'ostéoarthrose, comme nous l'avons vu, il est encore très compliqué d'atteindre cet objectif du fait de l'évolution lente et imprévisible de l'affection, des outils diagnostics peu sensibles, et des moyens thérapeutiques imparfaits (Karsdal, 2014). Tout l'enjeu réside alors dans l'identification et la caractérisation de biomarqueurs adaptés permettant de répondre aux objectifs de la médecine personnalisée (tab V).

Tableau V : les objectifs de la médecine personnalisée [d'après (Sawitzke, 2013)]

| | |
|---|---|
| **Diagnostic** | - Sensibilité<br>- Précision |
| **Thérapeutique** | - Définir le pronostic<br>- Evaluer l'activité et la progression de la maladie<br>- Optimiser l'efficacité du traitement |
| **Coûts** | - Minimiser les coûts liés à la maladie |
| **Sécurité** | - Minimiser les effets secondaires liés au traitement |

Un biomarqueur performant devrait rassembler plusieurs qualités telles que (Sawitzke, 2013) :

- ✓ facilité d'acquisition de l'échantillon biologique nécessaire à son identification (par exemple : prise de sang, urine…)
- ✓ tests d'identification disponibles et performants
- ✓ stabilité durant le temps de stockage
- ✓ représentativité vis-à-vis d'un ou de plusieurs objectifs de la médecine personnalisée

Actuellement pour l'OA il existe très peu de de biomarqueurs rassemblant ces qualités mais les recherches se poursuivent et les biomarqueurs sont considérés comme des atouts précieux dans le soin aux patients atteints d'ostéoarthrose. On peut citer par exemple une mutation dans le gène GDF5 qui prédisposerait à une diminution du potentiel de réparation du cartilage, ou encore une mutation dans le gène codant pour l'IL-1 qui favoriserait l'inflammation et donc la progression de l'OA (Karsdal, 2014). Concernant les biomarqueurs, le problème de l'interprétation des résultats par le clinicien doit être pris en compte et des mesures d'intégration de ces biomarqueurs et des données cliniques sous forme d'un « score d'ostéoarthrose » apparaissent comme une solution intéressante dans la progression vers une médecine personnalisée et performante (Sawitzke, 2013).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'inflammation est une grande « ennemie » à combattre dans l'ostéoarthrose. Pour ce faire, de nombreux traitements mentionnés sont combinés pour obtenir un effet additif voire synergique comme par exemple les AINS et l'acide hyaluronique. Mais nous avons seulement commencé à comprendre les implications moléculaires de l'inflammation ostéoarthrosique et sa résultante sur la dégradation des tissus articulaires. Cette avancée difficile des connaissances est en partie due aux difficultés techniques et financières liées au rassemblement d'un nombre significatif de chevaux atteints d'ostéoarthrose ainsi qu'au diagnostic délicat et souvent tardif de la pathologie. De nombreuses études restent cependant à mener et le praticien doit se tenir informé des nouvelles thérapies et de la littérature récente afin d'espérer un jour réussir à traiter cette pathologie aux répercussions désastreuses (Goodrich, 2006) (Clegg, 2006).

## IV. Les cellules stromales mésenchymateuses et leurs applications en médecine vétérinaire équine

L'utilisation des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) en médecine vétérinaire équine ne cesse de progresser à un rythme plus rapide que les preuves scientifiques et cliniques disponibles. Il existe très peu de données cliniques obtenues de manière totalement rigoureuse et sur le long terme concernant les CSM. La diversité des sources et types de CSM, leurs potentiels thérapeutiques variés et difficiles à préciser ainsi que leur retentissement politique délicat (comme en témoigne la frilosité de l'US Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis) sont autant de freins et d'obstacles à l'avancée des connaissances. Pourtant, un avènement de la thérapie cellulaire permettrait de toucher du doigt la possibilité de révolutionner le traitement de certaines pathologies comme l'ostéoarthrose en passant d'une difficile gestion de la maladie à sa guérison complète tant chez l'Homme que chez l'animal (Mobasheri, 2014) (Schnabel, 2013).

### A. Définitions et terminologie

Dans « cellule souche », le terme « souche » indique la capacité de ces cellules à se renouveler indéfiniment. En effet, ces cellules progénitrices immatures sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en de multiples lignées cellulaires grâce à un processus de mitose asymétrique qui aboutit à deux cellules filles, l'une est identique à la cellule souche, indifférenciée et sans caractéristique tissulaire spécifique, et l'autre est capable de se différencier en cellule plus mature (Krampera, 2007). Les cellules « souches » sont capables de se diviser pendant une très longue période grâce à des mécanismes de surveillance qui détectent les erreurs de réplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Il y aurait par exemple intervention de la protéine p53 connue

pour son rôle anti-tumoral et pro-apoptotique. Les cellules dans lesquelles apparaissent des erreurs sont alors éliminées afin d'éviter la formation de tumeur par mutation d'une cellule « souche » et prolifération de cette cellule mutée (Morrison, 2008). Par ailleurs, les cellules souches possèdent une capacité unique à protéger les télomères de leurs chromosomes grâce à l'expression de la télomérase. Cette dernière est une enzyme qui protège les télomères et permet de maintenir le génome complet au cours des divisions (Asahara, 2000).

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont un type de cellules « souches » définies comme des progéniteurs non hématopoïétiques caractérisés par leur capacité d'adhérence au plastique, l'expression de marqueurs phénotypiques non spécifiques et leur potentiel de différenciation en cellules de la voie mésodermique. Résidant dans de nombreux tissus, les sources disponibles de cellules stromales mésenchymateuses sont multiples et inclues à la fois les tissus adultes et les tissus fœtaux (Roux, 2011) (fig 26).

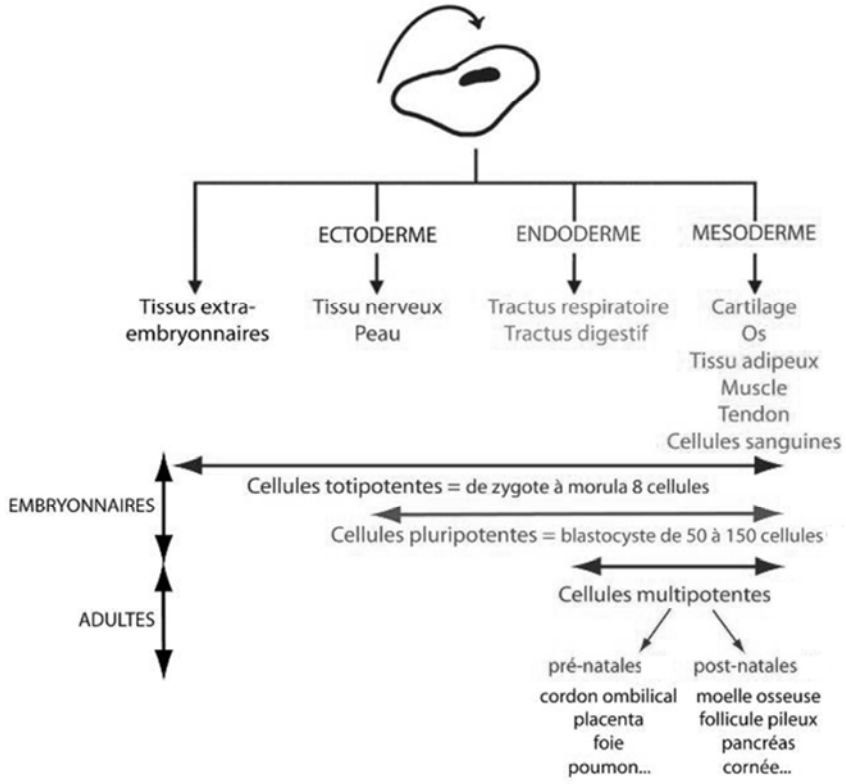



Figure 26 : classification des différents types de cellules stromales (Bourzac, 2009)

## B. L'importance de la niche des CSM

Le microenvironnement local physiologique qui abrite et régule les cellules stromales est appelé « niche ». Décrite pour la première fois en 1978 (Schofield, 1978), la notion de niche est

restée longtemps plus théorique que réelle et ce n'est que récemment que des études ont confirmé sa présence.

La niche est un microenvironnement extrêmement complexe, spécialisé, hautement régulé et interactif qui contrôle le devenir des CSM de façon spatio-temporelle. Chaque niche est composée des cellules qui sont en contact avec les CSM, de la matrice extracellulaire et des molécules solubles qui s'y trouvent (Bourzac, 2009).

La niche très spécifique du type de CSM qu'elle abrite. Malgré leur grande diversité, il est tout de même possible de dégager les caractéristiques commune d'une niche (Bismuth, 2008) (Eshghi, 2008) :

- Elle est constituée par un groupe de cellules dont le rôle est le maintien des cellules stromales.
- La niche a un rôle de support physique et nutritif.
- Elle sécrète des facteurs extrinsèques qui contrôlent le devenir des CSM et leur nombre. Ces facteurs sont très nombreux et variables bien que certaines molécules se retrouvent chez tous les mammifères comme BMP (bone morphogenic protein). Les CSM sont ainsi régulées à la fois par un programme intrinsèque et à la fois par des facteurs extrinsèques provenant de la niche.
- La niche possède une structure asymétrique. A la suite d'une division, une cellule est maintenue dans la niche et devient une cellule souche (auto-renouvellement) tandis que l'autre cellule quitte la niche, prolifère et s'engage dans une voie de différenciation.
- La niche joue un rôle dans la dégénération des CSM en cas de dommage au niveau de leur ADN. En ajoutant à ce rôle celui de régulateur de la division et du nombre de CSM, on peut dire que la niche a également un rôle anti-tumoral. Néanmoins, il peut exister un état réfractaire des CSM aux signaux de la niche et/ou des modifications du microenvironnement rendant la niche anormale. Une tumeur peut alors faire son apparition.

La niche des CSM a donc un rôle capital dans la vie et le devenir des cellules. C'est la raison pour laquelle dans notre étude ultérieure, nous nous attarderons sur l'étude du LS en tant que niche atypique des CSM.

## C. Autres propriétés

### 1. Prolifération et différenciation

Les cellules stromales constituent des réservoirs remplaçant les cellules endommagées ou vieillissantes. De ce fait, elles participent à l'homéostasie tissulaire.

Les cellules stromales adultes ont une durée de vie plus courte que les cellules stromales embryonnaires, de plus leur nombre au sein des tissus diminue avec l'âge. Ce nombre dépend également du site de prélèvement et de l'état de santé du donneur.

Comme nous venons de le voir, lorsque les cellules stromales sont soumises à des signaux biologiques spécifiques tels que la pression partielle en oxygène, le pH du milieu extracellulaire, des stimuli mécaniques ou par contact avec d'autres cellules, elles se différencient en cellules spécialisées qui correspondent aux besoins de l'organe dans lequel elles se trouvent (fig 27) (Bourzac, 2009).

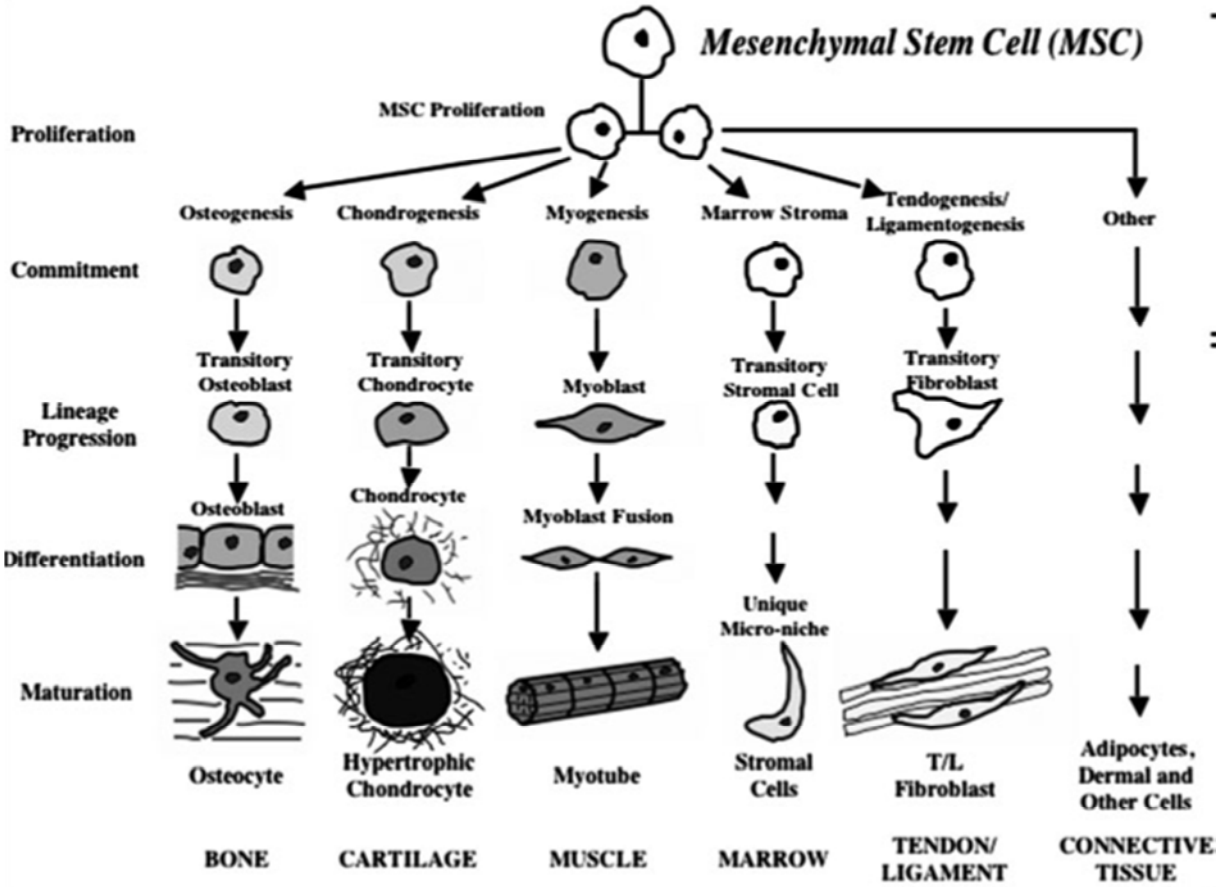



Figure 27 : illustration des capacités de différentiation des cellules stromales mésenchymateuses (Caplan, 2007)

## 2. Plasticité des cellules stromales

Les cellules stromales possèdent un potentiel de différenciation dépassant leur lignage cellulaire. Ainsi, les cellules stromales adultes ne sont pas pluripotentes *sensu stricto,* cependant elles peuvent se comporter comme tel grâce à différents mécanismes encore imparfaitement connus (Bismuth, 2008).

Il existerait 2 mécanismes possibles (en plus de la différenciation « classique » de la cellule stromale) :

- La transdifférenciation décrit la conversion d'une cellule d'un certain lignage en un autre lignage avec perte concomitante des marqueurs et des fonctions liés au tissu d'origine afin d'acquérir ceux du nouveau lignage (fig 28). Cela implique donc des reprogrammations nucléaires et constitue ainsi une forme de métaplasie.

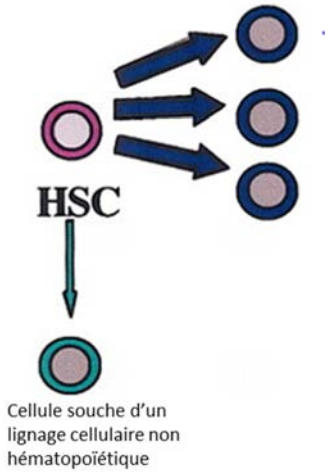



**Figure 28 : exemple de transdifférenciation d'après Herzog (2003)**
*HSC : cellule stromale hématopoïétique*

- La fusion cellulaire correspond à l'union entre une cellule stromale et une cellule différenciée (fig 29).

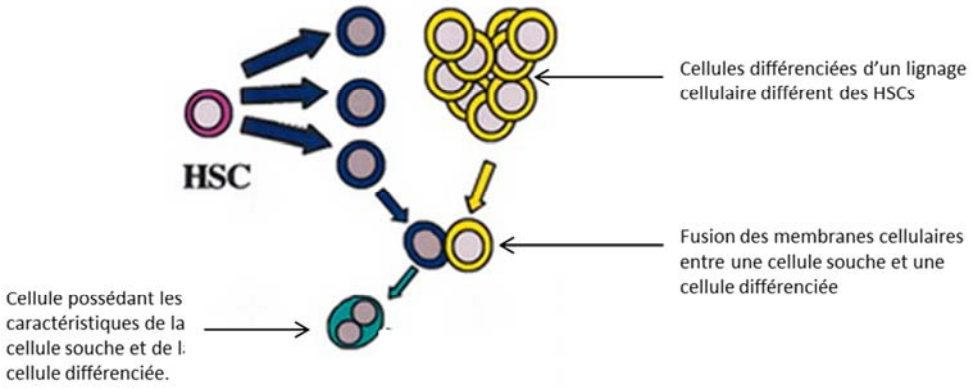



**Figure 29 : exemple de fusion d'après Herzog (2003)**

### 3. Effets autocrines et paracrines

Initialement, l'hypothèse permettant d'expliquer la réparation des tissus après un traitement à base de cellules stromales était la différentiation de ces dernières en cellules du tissu lésé et la repopulation de l'organe. Cependant, le faible taux de survie des cellules après implantation (de 1 à 5 %), la rapidité d'apparition de l'effet bénéfique (amélioration de la fonction organique en moins de 72h, temps insuffisant pour la différentiation et la régénération) et surtout le fait qu'une amélioration de la fonction organique et de la lésion puissent être reproduites lors de l'utilisation d'un milieu acellulaire ayant contenu des cellules stromales contredisent cette hypothèse et suggèrent l'intervention de facteurs paracrines (Bourzac, 2009).

On a constaté qu'après leur administration, les cellules stromales mésenchymateuses migrent préférentiellement vers les tissus endommagés. Elles ont alors un effet bénéfique dans de nombreux modèles animaux de lésions tissulaires par un mécanisme non encore défini. Les mécanismes impliqués dans la réparation semblent être la production de facteurs trophiques, anti-inflammatoires et antiapoptotiques, ainsi que leur capacité de différenciation in situ (Roux, 2011). Plusieurs études ont ainsi mis en avant l'implication de facteurs paracrines qui semblent intervenir selon différents mécanismes comme par exemple (Bourzac, 2009):

- L'augmentation de l'angiogénèse grâce au VEGF par exemple, ce qui améliore la perfusion sanguine régionale ainsi que la protection et la survie des tissus.
- L'autoguidage ou « homing » qui correspond à la propriété des cellules de migrer vers un tissu lésé sous l'influence de signaux tels que les chémokines libérées lors de lésion tissulaire (IL-8, MCP-3…)
- Le remodelage de la MEC qui s'effectue par l'augmentation de la cellularité et la diminution de la production des protéines de la MEC comme les collagènes de type I ou les TIMP-1.

### 4. Immunomodulation

Les cellules stromales mésenchymateuses ont une action immunosuppressive sur l'immunité innée et adaptative qui a été démontrée à la fois in vitro et in vivo dans des modèles animaux d'auto-immunité (Roux, 2011). Les CSM sont ainsi considérées comme hypoimmunogènes du fait de leur très faible niveau d'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH-I, -II), de leur absence d'expression de molécules stimulatrices du système immunitaire et de leurs actions à de nombreux niveaux de la réponse immunitaire comme nous pouvons le voir sur la figure 30.

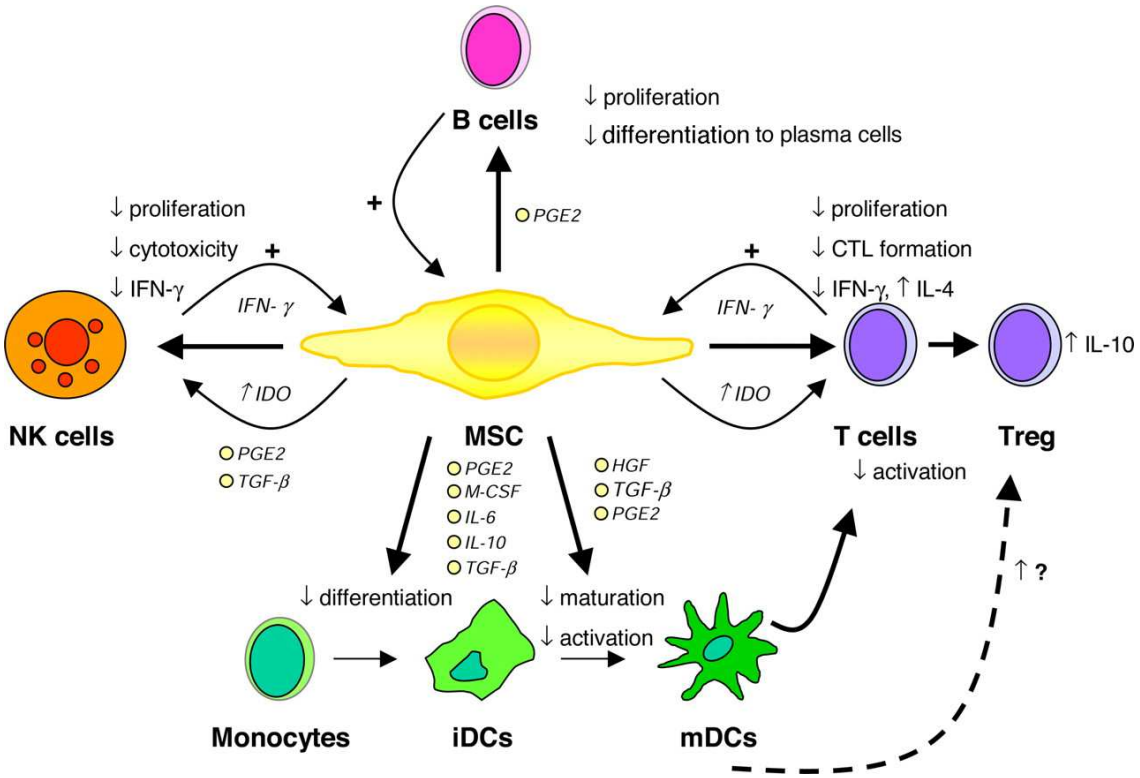



**Figure 30 : les effets immunomodulateurs des CSMs (Nauta, 2007)**
*CTL = lymphocyte T cytotoxique ; HGF = facteur de croissance hépatique ; IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase*

Ces propriétés immunosuppressives démontrées permettent actuellement d'utiliser les cellules stromales mésenchymateuses dans un contexte allogénique. Néanmoins, cette utilisation demande encore davantage d'investigations (Roux, 2011). En effet, il a été démontré que les CSMs ont la capacité de se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène en exprimant le CMH-II et ainsi induire une réponse immunitaire (Chan J. T., 2006). En conséquence, bien que ces cellules représentent aujourd'hui un candidat prometteur dans la thérapie cellulaire de pathologies, leur potentiel immunogène est à approfondir et doit être gardé à l'esprit.

## D. Les sources de cellules stromales chez le cheval

Les deux types de cellules stromales les plus couramment utilisés en médecine vétérinaire équine sont issus de chevaux adultes et proviennent soit de la moelle osseuse soit du tissu adipeux (fig 31) (Schnabel, 2013).

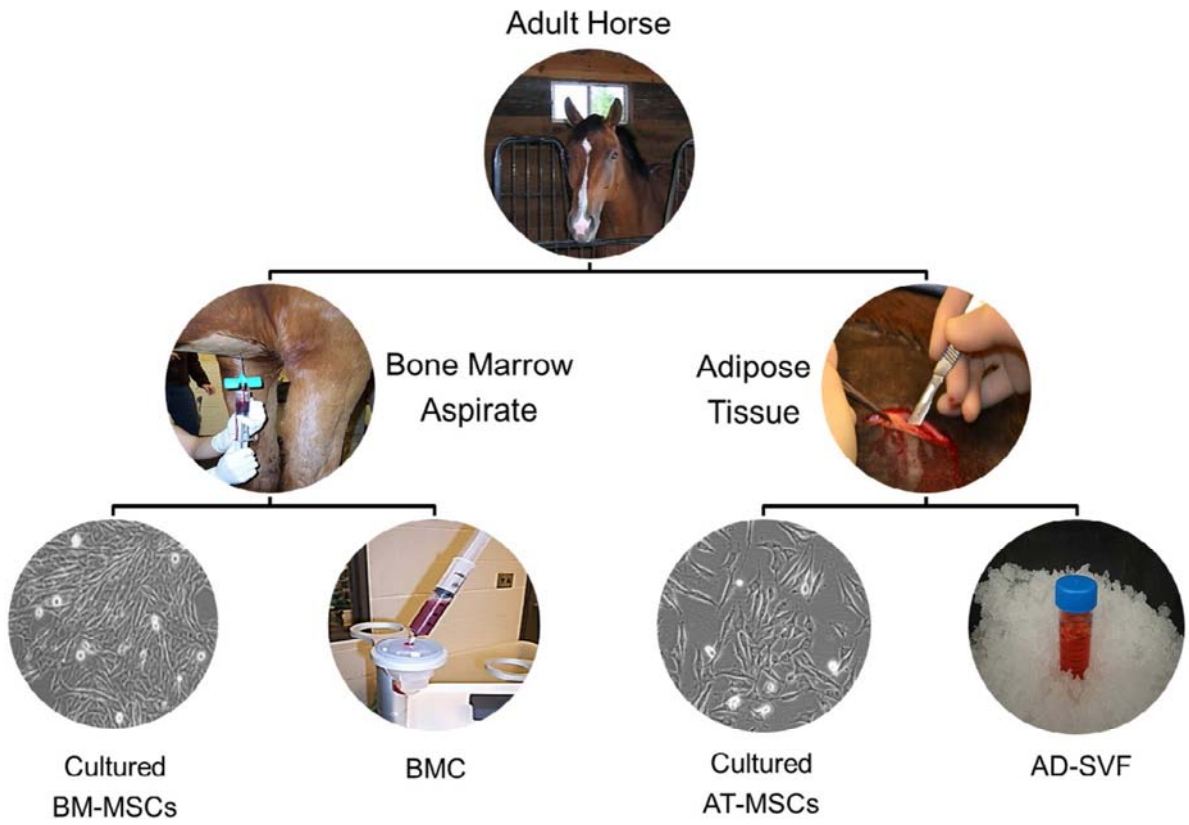



**Figure 31 : les deux sources de CSM équines les plus couramment utilisées et leurs produits dérivés (Schnabel, 2013)**
*L'aspiration de moelle osseuse peut se faire au niveau du sternum ou du tuber coxae (angle de la hanche, non représenté). Le matériel obtenu peut être soit cultivé 2 à 3 semaines pour obtenir des CSM (BM-MSCs), soit immédiatement traité pour obtenir un concentré de moelle osseuse (BMC) directement administrable au patient. Le tissu adipeux est préférentiellement prélevé au niveau de la base de la queue. De la même façon, le tissu obtenu peut être soit mis en culture pour obtenir des CSM (AT-MSCs), soit digéré pour obtenir une population hétérogène de cellules stromales (AD-SVF)*

Pourtant, ces sources de CSM nécessitent des procédures de prélèvement invasives pouvant être associées à un pneumopéricarde pour la moelle osseuse sternale ou à d'autres complications présentant des risques pour l'animal donneur. De plus, la capacité de prolifération et de différenciation des CSM issues de ces sources est inversement proportionnelle à l'âge du donneur et au nombre de passages *in vitro* (Lange-Consiglio, 2012).

Toutefois, en plus de ces deux sources de cellules stromales chez l'animal adulte, plusieurs provenances de cellules stromales néonatales équines sont décrites. On peut citer les fibroblastes fœtaux, le sang ou la matrice du cordon ombilical, le placenta ou encore le liquide amniotique (Schnabel, 2013) (Kang, 2012). Le cordon ombilical ou les annexes fœtales constituent des sources riches en CSM dont la collection ne présente pas de risque. En outre, puisque l'épithélium amniotique se développe antérieurement à la gastrulation, qui est un « point de basculement » où le destin des cellules est spécifié, on peut penser que les cellules stromales pluripotentes pourraient être présentent dans l'amnios même au terme de la gestation (Lange-Consiglio, 2012). De plus, les CSM issues de la membrane amniotique, en plus du caractère non invasif et du faible coût de leur

collecte, présentent une prolifération plus rapide et un potentiel de différentiation plus grand (Lange-Consiglio, 2012). Il a également été démontré que les CSM issues de cordons ombilicaux sont non-tumorigènes (Mobasheri, 2014).

Par ailleurs, bien que les CSM soient souvent décrites comme « immuno-privilégiées » et de ce fait perçues comme un traitement sans risque de rejet par l'organisme receveur, certains résultats tels que ceux de Schnabel (2013) démontrent que 90% de leurs CSM issues de chevaux adultes en culture précoce (c'est-à-dire avec un faible nombre de passages) expriment le CMH-II. Cela suggère que ces CSM seraient capables de déclencher une réponse immunitaire similaire à la notion de groupage sanguin. Néanmoins, Carrade *et al*. (2011 a,b) ont injecté de manière répétée des CSM issues de cordon ombilical et de placenta sans déclenchement de réponse immunitaire. En effet, comme nous l'avons vu, les CSM ont un potentiel immunomodulateur propre et, de surcroit, un tissu tel que le placenta est essentiel pour le maintien de la tolérance mère-fœtus pendant la gestation, ce qui suggère que les cellules placentaires pourraient potentiellement présenter des propriétés immunomodulatrices. Par conséquent, les CSM néonatales sembleraient moins enclines que leurs semblables issues d'animaux adultes, à déclencher une réponse immunitaire de rejet (Lange-Consiglio, 2012).

Pour terminer, notons qu'il n'existe pas de consensus relatif aux conditions de culture permettant de guider la différenciation des CSM vers un phénotype stable particulier comme le chondrocyte par exemple. Il n'existe pas non plus de consensus concernant la manière d'isoler, d'identifier et de caractériser les CSM. Ce travail pour l'instant relativement empirique et hétérogène entre les équipes de recherche nécessite d'être précisé (Mobasheri, 2014).

## E. Les utilisations actuelles chez le cheval

Les thérapies cellulaires appliquées aux pathologies ostéo-articulaires équines sont utilisées depuis une trentaine d'années en tant que tentative de réponse aux limites des traitements médicaux et chirurgicaux face à ces pathologies et à leurs impacts significatifs sur les performances des chevaux (Frisbie D. S., 2011). La thérapie à base de CSM la plus étudiée aujourd'hui est celle s'appliquant à la tendinite.

### 1. Tendinite et desmite ligamentaire

Une étude récente portant sur 52 chevaux de sport atteints de tendinite ou de desmite ligamentaire a montré que 77% d'entre eux ont pu reprendre un travail de même intensité, voire

d'intensité supérieure à celui pratiqué avant la blessure, après un traitement à base de CSM issues de sang de cordon ombilical (Van Loon, 2014).

Pour le traitement de lésions discrètes et focales, les CSM sont injectées directement dans la lésion de manière aseptique et sous contrôle échographique (Schnabel, 2013). En ce qui concerne les lésions multiples, diffuses ou celles du ligament suspenseur les CSM sont injectées lentement par voie intraveineuse locorégionale (Schnabel, 2013).

Le nombre optimal de CSM à injecter pour le traitement de lésions des tendons ou des ligaments ne fait pas consensus. La dose la plus courante décrite est de $10x10^6$ CSM par lésion mais aucune étude n'a établi de relation entre une dose de CSM et une réponse au traitement. Il en est de même pour le nombre d'injections à réaliser ainsi que leur fréquence. En effet, la majorité des publications s'appuient sur une injection unique, mais il est possible en pratique de renouveler l'injection après 30 jours si l'amélioration clinique et échographique n'est pas satisfaisante. En outre, bien que d'autres études doivent être menées pour déterminer si les CSM sont plus ou moins efficaces que le PRP dans le traitement des tendinites ou si leurs effets sont additifs voire synergiques, il est fréquent en pratique clinique de réaliser une injection de PRP et de prélever des CSM au moment du diagnostic, puis de réaliser une nouvelle injection de PRP couplée à une injection de CSM lorsque ces dernières sont prêtes (Schnabel, 2013).

### 2. Fourbure

Beaucoup d'espoirs sont fondés sur l'éventuelle capacité des CSM à traiter la fourbure. Cependant, peu étude n'ont à ce jour évalué l'innocuité et l'efficacité des CSM dans le traitement de cette pathologie dévastatrice. Carter *et al.* (2011) ont montré que des chevaux atteints de fourbure présentent une perte de cellules stromales épidermique p63 positives ce qui n'est pas le cas des chevaux sains. Néanmoins, on ne sait pas si l'administration de CSM même issues de l'épiderme, pourrait apporter ce type de cellules stromales (Schnabel, 2013).

En ce qui concerne la fourbure, les praticiens appliquent une posologie empirique. Ainsi, une perfusion intraveineuse locorégionale de CSM en utilisant la veine digitale latérale au niveau de l'os sésamoïde est souvent privilégiée. Idéalement, les CSM devraient être injectées en phase aigüe afin de profiter de leurs propriétés anti-inflammatoires. Effectivement, une première injection est la plupart du temps effectuée le plus tôt possible en phase aigüe puis une seconde 14 jours après. Il est par contre certain que dans le traitement de la fourbure, l'administration de CSM ne dispense pas de la recherche de la cause sous-jacente de la pathologie ainsi que des mesures hygiéniques (Schnabel, 2013).

## F. Ostéoarthrose et cellules stromales mésenchymateuses

### 1. Potentiels d'action

La faible capacité du cartilage hyalin à se régénérer est connue depuis longtemps. Chez le cheval, de nombreuses stratégies originales ont été mises au point avec plus ou moins de réussite pour tenter de rendre ses fonctions au cartilage endommagé. On peut par exemple citer les techniques de greffe, la création de microfractures dans l'os sous-chondral, ou encore la transplantation de chondrocytes. Chez l'Homme, le remplacement total de l'articulation lésée constitue toujours le traitement de choix en cas de maladie articulaire avancée (Frisbie D. S., 2011).

Compte-tenu de leur capacité théorique à subir la différenciation chondrocytaire, les CSM sont apparues comme une piste thérapeutique envisageable dans le traitement des lésions cartilagineuses. Des études expérimentales portant principalement sur des animaux de laboratoire ont majoritairement montré une bonne réparation du cartilage avec une thérapie à base de CSM. Néanmoins, il est difficile de déterminer la pertinence clinique de ces résultats chez des espèces de grande taille avec des articulations très mobiles et très sollicitées tel que le cheval. Chez ce dernier, des essais d'injection de cellules stromales préalablement mises en culture sur une matrice de fibrine ont été réalisés mais n'ont pas démontré d'avantage à long terme dans la réparation du cartilage. Les CSM ont également été utilisées expérimentalement pour délivrer des gènes d'intérêt au niveau du site lésionnel. Par exemple, des CSM ont été transduites avec des vecteurs adénoviraux exprimant des ligands BMP et injectées chez le rat et le lapin, ce qui a amélioré la réparation du cartilage endommagé sans pour autant permettre une récupération totale des fonctions articulaires initiales (Frisbie D. S., 2011).

De ce fait, deux nouvelles techniques de pointe impliquant des cellules stromales semblent aujourd'hui se développer et trouver leur place dans le traitement des pathologies articulaires (Frisbie D. S., 2011) :

- La première se base sur la mise au point de biomatériaux acellulaires capables de recruter des cellules progénitrices et de créer un environnement optimal au sein de l'articulation afin de stimuler la régénération du cartilage hyalin ;
- La seconde, celle qui nous intéresse ici, est l'injection de CSM seulement mises en culture en intra-articulaire. En effet, des études menées chez l'Homme et chez l'animal montrent que les CSM administrées en intra-articulaire sont capables de restaurer le volume du cartilage articulaire et d'améliorer les signes cliniques liés à l'ostéoarthrose pendant plusieurs mois après leur administation et ce d'une manière supérieure aux effets d'injections d'acide

hyaluronique. Or, initialement vouées à un rôle de régénération pure du cartilage, il semblerait que les CSM aient d'autres effets dominants dans le traitement des pathologies articulaires, notamment l'ostéoarthrose.

En effet, comme nous l'avons vu, l'organe diarthrosique est atteint dans son ensemble lors d'ostéoarthrose (fig 32). Par conséquent, traiter une telle pathologie ne peut pas se cantonner à traiter une seule composante tel que le cartilage (Frisbie D. S., 2011).

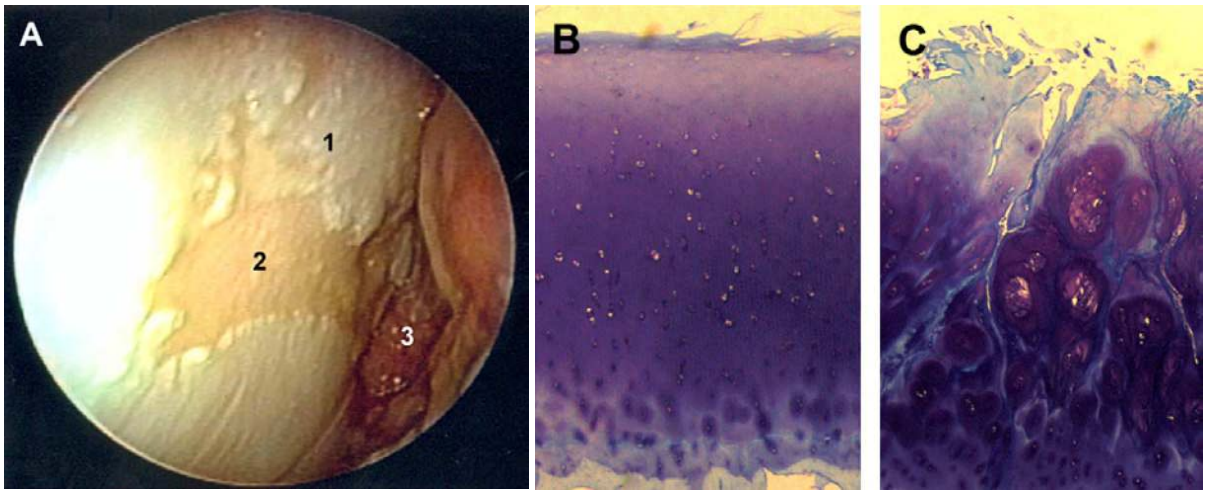



**Figure 32 : changements pathologiques dans l'ostéoarthrose équine (Frisbie D. S., 2011)**
*(A) l'ostéoarthrose entraîne une fibrillation et une fissuration du cartilage articulaire [1], voire la perte complète du cartilage avec des modifications de l'os sous-chondral associées [2] mais également une hyperplasie et une congestion de la membrane synoviale [3]. (B) aspect histologique d'un cartilage sain. (C) Aspect histologique d'un cartilage issu d'une articulation atteinte d'ostéoarthrose (coloration au bleu de toluidine). On voit la formation de fissures profondes, une irrégularité de la surface, une réduction de la densité cellulaire et une perte de protéoglycanes (régions pâles)*

De plus, plusieurs études ont montré qu'une fois injectées en intra-articulaire, les CSM se localisent préférentiellement au niveau des tissus mous articulaires avec peu ou pas d'adhérence au niveau du cartilage hyalin. Ainsi, les effets bénéfiques de l'injection de CSM au sein d'une articulation ostéoarthrosique sont vraisemblablement induits par des facteurs solubles et/ou par des effets sur d'autres tissus articulaires (Frisbie D. S., 2011).

Effectivement, il a été récemment découvert que les CSM agiraient plutôt *via* leurs sécrétions dépendantes de leur environnement. Ainsi, dans un environnement inflammatoire, les CSM subissent des modifications dans l'expression de leur génome et sécrètent des molécules capables de moduler la réponse immunitaire et des facteurs trophiques influençant la réponse cellulaire à une agression. Ces molécules sécrétées capables d'influer sur la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose cellulaire comprennent (Vézina, 2013):

- des facteurs de croissance : facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), facteur de croissance insulinique 1 (IGF-1), facteur de croissance transformant b (TGF-b1) ;

- des cytokines : TNF-α, IL-6 ;
- des chimiokines : IL-8…

Comme nous l'avons démontré dans les parties précédentes, l'inflammation est une composante centrale de la pathobiologie de l'ostéoarthrose. De ce fait, des cytokines inflammatoires telles que le TNF-α ou l'IL-1β jouent un rôle clef dans la dégradation de la matrice cartilagineuse. Ainsi, les CSM offrent une perspective de traitement prometteuse puisqu'elles seraient capables d'agir à deux niveaux essentiels à savoir l'inflammation et la stimulation de la réparation des tissus diarthrosiques (Vézina, 2013).

Plusieurs études vont dans le sens de ces observations encourageantes. En effet, des injections intra-articulaires de CSM dans des articulations instables ont réduit significativement la dégénérescence du cartilage hyalin, la sclérose sous-chondrale, la formation d'ostéophytes et ont favorisé la régénération méniscale. Par ailleurs, une diminution significative de la concentration synoviale de prostaglandine E2, molécule inflammatoire, a été observée après injection de CSM dans des articulations ostéoarthrosiques (Vézina, 2013). De surcroît, *in vitro*, en présence de LS issu d'articulation atteinte d'ostéoarthrose, des CSM ont augmenté significativement leur expression d'IDO (indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase), une enzyme immunomodulatrice. Les facteurs immunomodulateurs sécrétés par les CSM aurait en effet une puissante capacité démontrée également *in vitro* par l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T après l'ajout de CSM dans des réactions lymphocytaires mixtes, par l'arrêt de la production d'anticorps par les lymphocytes B ainsi que par la paralysie des cellules présentatrices d'antigène (Leijs, 2012).

Il est cependant important de souligner que la stimulation des CSM par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'IFN-δ amplifie fortement leur fonction immunosuppressive (Leijs, 2012). Vézina *et al.* (2013) ont aussi montré *in vitro* que la stimulation des CSM par des molécules fortement pro-inflammatoires telles que le LPS et l'IL1-β a augmenté l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF-a, IL-8 et IL-6, IL-1b et l'IL-8), ce qui n'était pas le cas avec des CSM en présence de LS ostéoarthrosique. Notons que dans la même étude, l'expression d'IL-1β a été diminuée en présence indifféremment de LS sain ou pathologique. De ce fait, puisqu'un environnement particulier peut potentiellement affecter le profil sécrétoire des CSM et modifier ainsi leur potentiel thérapeutique, il est crucial pour l'optimisation de cette forme de thérapie, de déterminer les effets de différents microenvironnements sur ces CSM. Or, peu d'études ont été menées concernant l'influence du LS sur la fonction des CSM. La plupart des études ont porté sur les effets promigratoires et de différenciation que possède le liquide synovial sur les CSM. Effectivement, le LS issu d'articulations saines contient des molécules qui stimulent la migration des

CSM, la concentration de ces molécules diminue dans le LS issu d'articulations ostéoarthrosiques ce qui a été associé à une moindre efficacité dans la cicatrisation des fractures. De plus, une étude a montré *in vitro* qu'à une concentration de 5%, le LS issu d'articulation ostéoarthrosique inhibe significativement la chondrogenèse par les CSM (Vézina, 2013).

### 2. Protocole thérapeutique

Dans le cadre du traitement de l'ostéoarthrose, les CSM peuvent être injectées seules ou couplées à d'autres traitements plus courants tels que l'acide hyaluronique ou les AINS. Ces derniers présentant l'avantage de limiter une éventuelle synovite réactionnelle post-injection de CSM. De la même façon que pour le traitement de la tendinite, le nombre de CSM à injecter n'est pas clairement défini. Les études publiées utilisent le plus souvent une gamme de $10x10^6$ à $20x10^6$ CSM par lésion de cartilage. La fréquence d'administration dépend là-encore de l'évolution clinique (Schnabel, 2013).

Par ailleurs, les CSM peuvent également être greffées directement dans la lésion sous contrôle arthroscopique afin de rester le plus proche possible de la lésion de manière prolongée. Dans la plupart des cas un système d'injection à double seringue est utilisée avec les CSM dans une seringue et de la thrombine bovine dans l'autre. Lors de l'injection les CSM et la thrombine bovine se mélangent et forment un caillot moulé sur la lésion. De la fibrine commerciale ou autologue peut également être utilisée pour fixer les CSM au niveau de la lésion (Schnabel, 2013).

Après une injection simple de CSM en intra-articulaire sans chirurgie, les chevaux peuvent reprendre progressivement leur activité après 3 à 10 jours de repos, comme s'il s'agissait d'une injection de corticoïdes par exemple. Suite à une procédure de greffe de CSM et/ou suite à une injection accompagnée d'une chirurgie de la zone, un protocole de rééducation doit être mis en place en fonction de l'étendue, de l'emplacement et de la nature de la lésion cartilagineuse. Par exemple, de jeunes chevaux opérés et traités avec des CSM pour ostéochondrite disséquante (OCD) sont généralement confinés au box pendant 2 semaines, puis des temps croissants de marche en main sont initiés. A 3 mois post-intervention, un examen clinique et radiographique de l'articulation affectée permet, si l'évolution est bonne, de laisser petit à petit le cheval libre au paddock. Un nouvel examen de contrôle clinique et radiographique à 6 mois post-opération détermine si le cheval est prêt à commencer le travail ou non (Schnabel, 2013).

## G. Effets secondaires potentiels

### 1. Transmission de pathogènes

Le risque d'infection est lié soit à une contamination des cellules stromales *ex vivo*, soit à une administration de cellules stromales issues d'un patient malade. Par ailleurs, les propriétés immunomodulatrices de ces cellules pourraient induire une immunosuppression favorisant le développement d'une infection, telle qu'une herpesvirose (Nauta, 2007) (Sundin, 2006).

### 2. Transformation maligne

Les cellules tumorales rassemblent plusieurs caractéristiques telles qu'un échappement à l'apoptose, des remaniements chromosomiques et la disparition de l'inhibition de contact. Or, il a été montré que des cellules stromales mésenchymateuses issues de tissu adipeux ont subi une transformation maligne spontanée suite à une culture prolongée en conditions de stress (Nauta, 2007). La transformation maligne serait liée à une augmentation graduelle de l'activité des télomérases et à une expression accrue du gène c-myc. Bien que le risque tumorigène des CSM soit très limité, dans le cadre d'une utilisation clinique, il est préférable de limiter le nombre de passage précédant l'utilisation des CSM (Miura, 2006).

### 3. Formations ectopiques

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il est supposé que la différenciation des CSM est essentiellement déterminée par le micro-environnement spécifique d'un tissu. Nonobstant, des calcifications ont été observées dans des myocardes de souris ayant reçu un traitement local à base de CSM (Nauta, 2007). Par ailleurs, il a été montré qu'entre 43 et 77 jours de culture (7 à 12 passages), la capacité de différentiation des CSM en ostéoblastes augmentait progressivement. Là-encore, limiter le nombre de passages permettrait de limiter le risque de minéralisation des tissus colonisés dans le cadre d'une utilisation thérapeutique des CSM (Wagner, 2008).

### 4. Immunogénicité

Comme nous l'avons décrit précédemment, bien que les CSM soient considérées comme hypoimmunogènes, les études restent imprécises. De ce fait, leur utilisation peut induire une réponse immunitaire de l'organisme receveur à garder à l'esprit et anticiper.

En résumé, les CSM constituent une thérapie prometteuse dans le traitement de l'ostéoarthrose bien qu'il existe des preuves montrent que les formulations de CSM utilisées ne sont pas efficaces dans toutes les formes de la pathologie. Néanmoins les informations ne sont encore ni assez nombreuses ni toutes assez pertinentes pour tirer des conclusions définitives (Frisbie D. S., 2011). Les propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices des CSM semblent être le pilier de cette thérapie et constituent des axes de recherche à poursuivre. Cependant, il sera d'une importance primordiale d'étudier préalablement les effets d'un LS ostéoarthrosique sur les CSM, ce qui passera inévitablement par une caractérisation du profil inflammatoire des LS issus d'articulations atteintes d'ostéoarthrose. Ce travail amènerait probablement à avancer dans la compréhension et le perfectionnement de la thérapie fondée sur les CSM dans l'ostéoarthrose, tout en soulevant vraisemblablement de nombreuses questions à investiguer.

## PARTIE II : étude expérimentale

Le but de cette étude est d'établir une méthode permettant dans un premier temps d'évaluer l'impact de la qualité du LS sur l'expression des CSM. Cela permettra par la suite de mieux comprendre l'activité anti-inflammatoire des CSM en présence de différents types de liquides synoviaux.

# I. Matériel, méthodes et études préliminaires

## A. Matériel biologique

### 1. CSM

A leur début, les cellules stromales mésenchymateuses ont été initialement isolées à partir de moelle osseuse. Or, cela représentait un acte invasif, avec un rendement cellulaire faible (0,001%-0,01%), et une quantité de cellules stromales inversement proportionnelle à l'âge du donneur. De fait, d'autres sources de CSM se sont développées telles que le tissu adipeux, le sang de cordon ombilical ou d'autres tissus fœtaux (Shaer, 2014).

Les CSM utilisées dans notre étude sont fournies par Vetbiobank, le premier laboratoire français de thérapie cellulaire et tissulaire vétérinaire qui propose différents produits de médecine régénérative pour les chevaux tels que des pansements biologiques et des cellules stromales pour le traitement des atteintes articulaires et tendineuses.

Lors du poulinage, une partie aussi grande que possible du cordon ombilical est récupérée proprement. La gelée de Wharton est ensuite extraite du cordon. Cette gelée est le tissu conjonctif primitif du cordon ombilical qui est enchâssé dans le tissu conjonctif de naissance (Shaer, 2014).
Plusieurs digestions sont nécessaires afin d'extraire les CSM de la gelée de Wharton. Les cellules ainsi obtenues sont mises en culture et amplifiées. Les CSM isolées à partir de gelée de Wharton sont très étudiées et présentent de nombreux avantages. Effectivement, ces CSM ont un temps de division plus court, se cultivent facilement dans des flasques en plastique, sont bien tolérées par le système immunitaire de l'organisme receveur (le risque de rejet chez le patient immunocompétent est faible), elles ont également des propriétés anticancéreuses, ne sont pas tumorigènes et leur récolte n'est ni douloureuse ni invasive (Kamolz, 2014) (Ribeiro, 2014). Ces CSM expriment les marqueurs CD29, CD90, CD44 et sont négatives pour le CD45.

Si elles ne sont pas utilisées dans l'immédiat, les CSM ainsi obtenues sont aliquotées en tubes Eppendorf© et congelées dans l'azote liquide à -196°C. Cette cryoconservation permettrait aux CSM de conserver leur capacité à se multiplier et à se différentier et ainsi préserverait leur potentiel

thérapeutique (Minonzio, 2014). Ginis *et al.* (2012) ont étudié la viabilité de cellules stromales issues de moelle osseuse humaine après différentes durées de cryoconservation. Après 1 mois de cryoconservation, 95% des cellules stromales étaient viables et après 5 mois, la viabilité des cellules se situait entre 72 et 80%.

## 2. Banque de liquides synoviaux pathologiques

### a. Prélèvement

Les LS pathologiques sont prélevés stérilement en bloc opératoire sur des chevaux présentés pour boiterie nécessitant une intervention chirurgicale sous anesthésie générale. Le LS est prélevé à la seringue et à l'aiguille fine, en minimisant au maximum la contamination sanguine. En effet, le LS ne contient normalement que très peu voire pas d'érythrocytes. Une contamination sanguine ferait donc varier les résultats d'analyses du LS, notamment la mesure de la valeur de la densité protéique réalisée dans notre étude. Néanmoins, Roquet *et al.* (2012) ont montré qu'un LS doit être contaminé par du sang à hauteur de plus de 50% de son volume pour présenter des résultats d'analyses modifiés. Or, macroscopiquement, une contamination de 10% du LS par du sang est déjà majeure (Roquet, 2012) et motive l'élimination du prélèvement de notre étude. Il n'est ainsi pas nécessaire de réaliser d'autres analyses pour estimer la contamination du LS par du sang.

L'anamnèse, les commémoratifs, les examens complémentaires, le diagnostic et les éventuels traitements des chevaux sont également renseignés (annexe 1).

### b. Analyses préliminaires

Plusieurs caractéristiques physiques du LS sont analysées immédiatement après le prélèvement (annexe 1).

- Le volume : il dépend directement de la taille de l'articulation ainsi que de sa communication éventuelle avec d'autres articulations. Les jeunes chevaux ont généralement un LS plus abondant que les chevaux âgés. Il a été montré que le volume de LS est augmenté lors d'hydarthrose du grasset et du tarse, mais pas lors d'ostéoarthrose (Ticiana, 2008).
- La couleur et la turbidité : un LS normal est jaune clair à jaune paille, clair et exempt de matériel. Lors de pathologie dégénérative, il peut devenir opaque et contenir du matériel floconneux. Un LS ambré est le plus souvent associé à une arthrite traumatique chronique sur fond hémorragique, la bilirubine non conjuguée colore alors le LS (Ticiana, 2008).

- La viscosité : elle est le reflet des propriétés lubrifiantes du LS. Une goutte de LS sain placée entre le pouce et l'index doit former un fil d'au moins 2,5cm de longueur avant de se rompre (Ticiana, 2008). Ce test est cependant en partie opérateur-dépendant.
- La densité protéique : Lors de troubles inflammatoires, la membrane synoviale ne joue plus pleinement son rôle de filtre et laisse passer certaines protéines telles que les globulines. De ce fait, la concentration en protéines totales dans le LS témoigne d'une inflammation lorsque celle-ci dépasse 2,5g/dL (Ticiana, 2008). La concentration protéique a été estimée ici avec un réfractomètre à main. Ce dernier mesure à l'aide d'un prisme en verre l'index de déviation de la lumière d'un liquide qui se modifie avec l'augmentation de la concentration des substances dissoutes (deuxième loi de Descartes). Le réfractomètre utilisé possède une échelle de densité urinaire et une échelle de densité protéique (Imbert, 2005).

### c. Conservation des liquides synoviaux

Le LS ainsi récolté et analysé est placé dans des tubes Eppendorf© non stériles hermétiques correctement identifiés. Les tubes sont ensuite stockés à -80°C.

### d. Synthèse de la banque de liquides synoviaux pathologiques

Notre banque de liquides synoviaux pathologiques ainsi constituée se compose de 33 prélèvements issus de 22 chevaux différents (annexe 1).

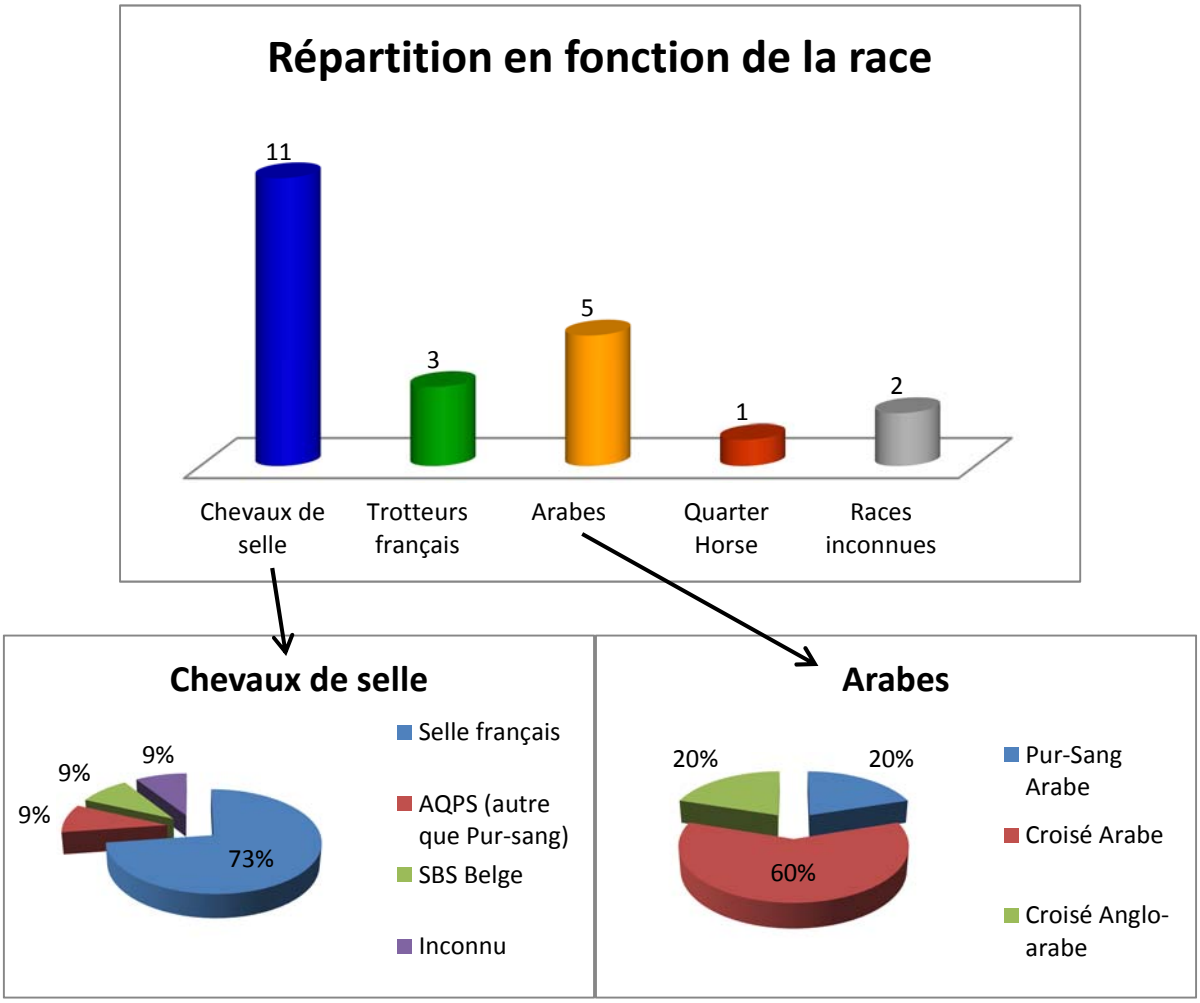
- **Sexe :**

**Tableau VI : répartition en fonction du sexe des chevaux dont sont issus les liquides synoviaux composant la banque de liquides synoviaux pathologiques**

| **Mâles = 10*, dont :*** | **Femelles = 11** |
|---|---|
| ✓ Entiers = 2<br>✓ Hongres = 7<br>✓ Inconnu = 1 | Inconnu = 1 |

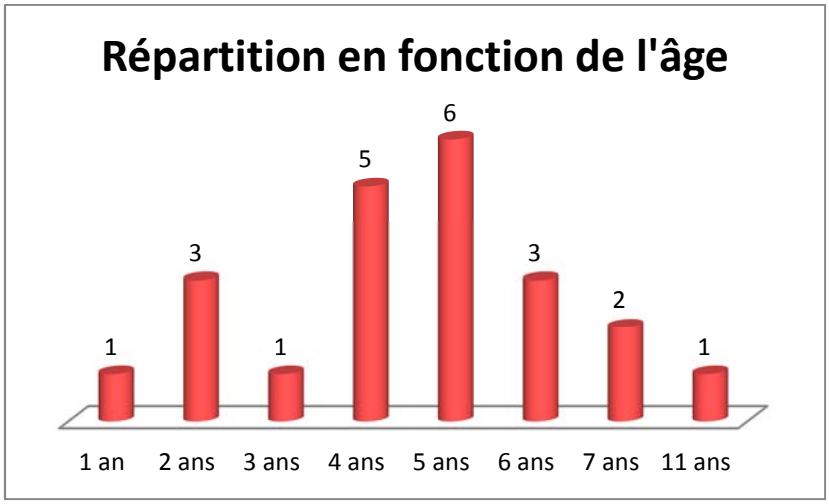
⇨ Nous avons sensiblement autant de mâles que de femelles

- **Race :**



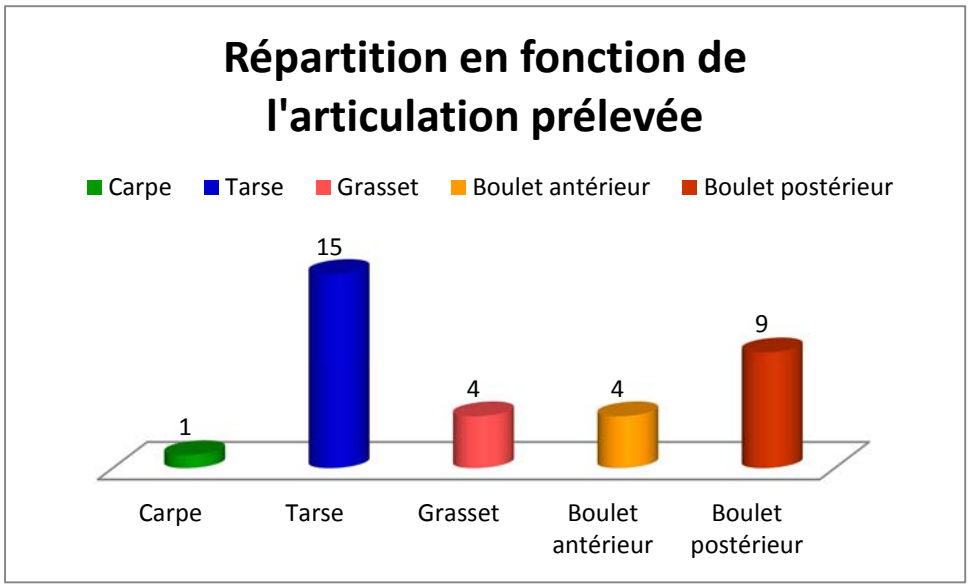

⇨ Les chevaux de selle représentent 50% des chevaux prélevés.

- **Age :**




⇨ 50% des chevaux ont entre 4 et 5 ans.

- **Articulations prélevées :**




⇨ Les articulations du tarse et des boulets représentent chacune 45% du total des articulations prélevées.

- **Pathologies :**

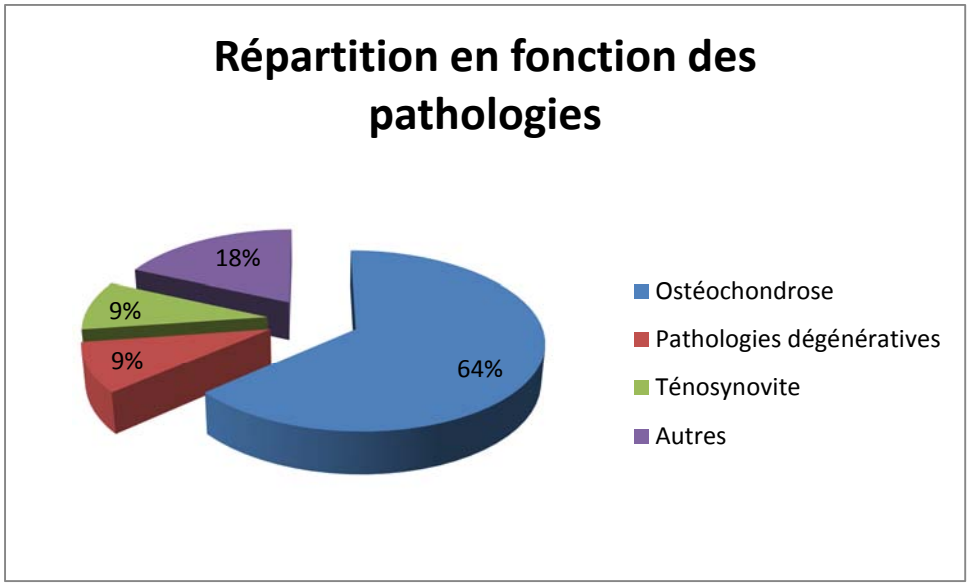


Tableau VII : détail des pathologies rencontrées chez les chevaux dont sont issus les liquides synoviaux composant la banque de liquides synoviaux pathologiques

| ***Ostéochondrose (OCD)*** | | ***Pathologies dégénératives*** | |
|---|---|---|---|
| - tarse | 10 | - syndrome articulaire dégénératif carpe | 1 |
| - boulet | 7 | - syndrome articulaire dégénératif boulet | 1 |
| - grasset | 1 | - arthropathie dégénérative grasset | 1 |
| - + arthropathie dégénérative | 1 | | |
| - + syndrome articulaire dégénératif | 1 | | |
| - + ostéoarthrose généralisée | 1 | | |
| ***Ténosynovite*** | | ***Autres*** | |
| - boulet | 2 | - fracture esquilleuse ouverte + desmopathie grasset | 1 |
| - +arthrite septique | 1 | - arthrite traumatique + fracture d'avulsion + déchirure des ligaments + subluxation tarse | 1 |
| | | - synovite + hémarthrose + lésions cartilagineuses + fragments osseux tarse | 1 |
| | | - hématome chronique + déchirure focale tarse | 1 |
| | | - arthrite + lésions cartilagineuses sévères | 1 |
| | | - fragments osseux boulet | 1 |

⇨ On note une nette prédominance de l'ostéochondrose (64%), en particulier du tarse et du boulet.

### e. L'ostéochondrose

L'ostéochondrose (OC) est une pathologie orthopédique du développement consistant en une altération idiopathique focale de l'os sous-chondral (étiologie encore non consensuelle). L'OC s'accompagne d'un risque d'instabilité et de lésion du cartilage articulaire pouvant entraîner une ostéoarthrose précoce. L'ostéochondrose est une pathologie fréquemment retrouvée chez les chevaux, les porcs, les chiens et l'Homme (Bates, 2014). Elle se caractérise par des signes de douleurs

articulaires, une effusion et un fonctionnement articulaire altéré du fait de la formation de fissures s'étendant du cartilage articulaire à l'os sous-chondral (McCoy, 2013).

Les termes d'ostéochondrose, d'ostéochondrite et d'ostéochondrite disséquante (OCD) sont souvent utilisés comme des synonymes, or ceci est trompeur. En effet, une distinction simple mais juste consiste à considérer l'ostéochondrose comme la maladie, l'ostéochondrite en tant que réponse inflammatoire à la maladie et l'ostéochondrite disséquante comme un type d'ostéochondrose dans lequel un fragment osseux peut être identifié (McIlwraith C. , 2011).

Les lésions kystiques de l'os sous-chondral sont aussi considérées par certains auteurs comme des manifestations d'ostéochondrose. Effectivement, ils considèrent que des lésions kystiques sous-chondrales ayant des répercussions cliniques dans les 2 premières années de vie du cheval sont des manifestations d'ostéochondrose, bien que ces lésions soient à l'origine d'une pathologie différente de l'OCD (fig 33). L'étude du tissu fibreux de lésions kystiques situées dans le condyle fémorale médial montre qu'elles produisent une plus grande quantité de PGE2, de MMP et de monoxyde d'azote. Par ailleurs, une hybridation *in situ* de sections de tissus fibreux provenant de ces lésions kystiques montre que les ARNm de l'IL-1β et de l'IL-6 sont davantage exprimés (McIlwraith C. , 2011). Ces études prouvent donc que l'ostéochondrose sous toutes ses formes peut créer un environnement inflammatoire marqué sur le long terme, propice au développement de l'ostéoarthrose.

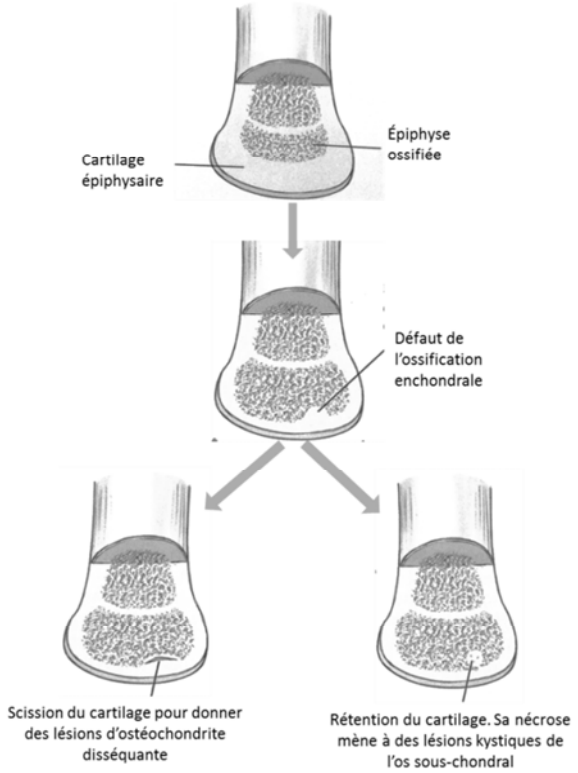



**Figure 33 : étiologie proposée de l'ostéochondrose menant à l'OCD ou aux lésions kystiques sous-chondrales (d'après McIlwraith, 2011)**

### f. Conclusion

Cette synthèse de notre banque de liquides synoviaux pathologiques nous permet de choisir les liquides synoviaux que nous faisons entrer dans notre étude.

En effet, dans un souci de comparaison, il s'agit de constituer un groupe de liquides synoviaux de chevaux d'une même tranche d'âge, d'une race analogue, dont les articulations prélevées sont atteintes d'ostéoarthrose ou d'une pathologie inflammatoire susceptible de générer de l'ostéoarthrose. Le choix se porte donc naturellement vers des chevaux de selle, âgés de 4 à 5 ans et atteints d'ostéochondrose. Or, afin de pouvoir réaliser plusieurs manipulations, il est également nécessaire de s'assurer que les liquides synoviaux sélectionnés sont en quantité suffisante.

Cela nous a amené à sélectionner 6 liquides synoviaux pathologiques (annexe 1) :

1) hongre Selle Français de 2 ans – tarse gauche (cheval n°2)

2) & 3) hongre Selle Français de 6 ans – tarse droit & tarse gauche (cheval n°3)

4) jument croisée Anglo-arabe de 5 ans – grasset droit (cheval n°11)

5) jument Selle Française de 4 ans – tarse gauche (cheval n°22)

6) jument Trotteuse française de 2 ans – tarse droit (cheval n°14)

## 3. Banque de liquides synoviaux sains

### a. Choix des chevaux prélevés

Dans le but d'être le plus cohérant possible, nous allons choisir les chevaux sains à prélever en fonction des liquides synoviaux pathologiques entrant dans l'étude.

Ainsi, le plus pertinent serait de prélever des tarses sains d'autant de juments que de mâles, de race de selle, en particulier Selle Français, entre 2 et 6 ans d'âge.

Forts de ces constatations, nous avons cherché au sein du troupeau pédagogique de l'école vétérinaire de Lyon les chevaux se rapprochant le plus de cette description :

- ✓ la race n'a pas pu être respectée car les chevaux appartenant au troupeau pédagogique sont d'origine non constatée.
- ✓ les chevaux les plus jeunes disponibles ont été choisis pour respecter au mieux l'âge souhaité.

- ✓ le sexe a été placé au second plan par rapport à l'âge des animaux.
- ✓ la réalisation des prélèvements s'inscrivant dans un but pédagogique de formation des étudiants, le chirurgien responsable a décidé de prélever les 4 boulets et les 2 grassets de deux chevaux.

De ce fait, les deux chevaux choisis sont :

1) Vaquero, hongre de 5 ans sans antécédent connu.
2) Renardo, hongre de 6 ans sans antécédent connu.

La banque de LS sains ainsi constituée (annexe 2) crée donc des biais dans notre étude car elle n'est pas comparable au groupe de LS pathologiques entrant dans l'étude au niveau de l'homogénéité de l'effectif, de la race et du sexe. De plus, les sites de prélèvement de LS sains sont les boulets et les jarrets et non les tarses, majoritaires dans le groupe de LS pathologiques. Or, bien qu'il n'existe pas de publication établissant des paramètres discriminant les sites articulaires, on peut se demander si cela ne créera pas des différences durant les essais.

### b. Protocole de prélèvement

Le protocole de prélèvement a été validé par le Comité d'éthique (saisine n°1225). Les deux chevaux sont tranquillisés avec le protocole suivant : detomidine 20µg/kg IV et butorphanol 25µg/kg IV. Afin de s'assurer que les chevaux ne présentent pas de boiterie, un bref examen orthopédique est réalisé : marche et trot en main en ligne droite et en huit de chiffre sur sol dur puis flexion globale de chaque membre. Les sites de prélèvement sont tondus et un nettoyage aseptique avec de la povidone iodée est réalisé. Le prélèvement est effectué à la seringue et à l'aiguille fine, stérilement.

A titre informatif, pour un cheval Pur-Sang ou demi-sang, entre 5 et 10 ans d'âge, pesant entre 445 et 485 kg, le volume de LS pour quelques-unes de ses articulations est le suivant (Ekman, 1981) :

- tarse = 39,8 ± 2,1 mL
- articulation radio-carpienne = 12,6 ± 1,5 mL
- articulation intercarpienne = 14,9 ± 0,6 mL
- boulet = 12,5 ± 1 mL

De plus, Il y a très peu de risque de prélever trop de LS car ce liquide a une vitesse de régénération très rapide. Un prélèvement de 5 à 10 mL peut donc être réalisé sans risque.

### c. Analyses liminaires

Le LS sain récolté subi les mêmes analyses physiques que le LS pathologique.

### d. Conservation

A l'image du LS pathologique, le LS sain récolté et analysé est placé dans des tubes Eppendorf© non stériles correctement identifiés. Les tubes sont ensuite stockés à -80°C.

## B. Etudes préliminaires

### 1. Objectifs

Dans la grande majorité des études portant sur les CSM et le LS, les cellules sont cultivées jusqu'à un certain taux de confluence, puis le LS est ajouté (Leijs, 2012) (Vézina, 2013). Or, lorsque les CSM sont injectées dans une articulation, elles exercent leurs effets en suspension dans le LS. Ainsi on peut se demander s'il ne serait pas plus pertinent d'appliquer cette observation *in vitro* en plaçant les cellules stromales en suspension dans le LS. Il est néanmoins difficile de prévoir l'effet de la mise en suspension sur les cellules stromales mésenchymateuses, il est donc nécessaire de l'étudier afin d'établir le protocole de manipulations de notre étude.

De plus, il se pose le problème de la concentration de LS à employer. En effet, il n'existe pas d'étude ayant travaillé sur l'effet de différentes concentrations de LS sur les CSM. Le plus souvent, les études sont menées avec une concentration de LS ne faisant pas l'objet d'une justification. Coleman et al. (2010) ont par exemple utilisé une concentration de 5% de LS issu d'articulation ostéoarthrosique. Song et al. (2010) ont utilisé quant à eux une concentration de 10% de LS.

Les questions de l'effet de la mise en suspension des CSM et de la concentration de LS à employer font donc l'objet d'une étude préliminaire nécessaire à l'établissement ultérieur du protocole de manipulation de notre étude.

### 2. Prérequis

Nous allons tout d'abord commencer par évoquer brièvement quelques outils importants qui nous serviront tout le long des manipulations.

### a. L'iodure de propidium (IP)

L'IP est un agent intercalant fluorescent qui se lie à l'ADN et à l'ARN avec peu ou pas de préférence dans les séquences de bases. Une fois que le colorant est lié à des acides nucléiques, sa fluorescence est 20 à 30 fois plus importante. L'IP ne passe pas les membranes cellulaires saines, il ne pénètre donc pas dans les cellules vivantes. De ce fait, l'IP est un outil couramment utilisé pour marquer les cellules mortes qui s'adapte à la microscopie à fluorescence, à la microscopie laser confocale, à la fluorimétrie ou encore à la cytométrie de flux (Nocker, 2006) (Cevik, 2003). C'est cette dernière technique que nous allons utiliser dans notre étude afin d'évaluer la viabilité des CSM.

Le protocole de marquage des cellules à l'iodure de propidium suivi dans notre étude est le suivant :

- Récupération des cellules en tube de contenance adaptée
- Ajout d'un volume de PBS égal au volume de la solution de CSM récupérée
- Centrifugation 2min30s à 150G
- Elimination du surnagent par pipetage
- Reprise du culot cellulaire dans 100µL de solution d'IP dilué au 10000$^{ème}$
- Passage sur cytomètre de flux immédiat

### b. Le cytomètre en flux – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) (Cambournac, 2012)

La cytométrie se définit comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Dans notre étude, le signal optique analysé est la fluorescence induite par le marquage IP ou le marquage du CMH I ou II. Ce signal est collecté par des photomultiplicateurs, puis est amplifié, numérisé, traité et stocké par un ordinateur.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs évènements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogramme ou de cytogramme (fig 34) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées. La fonction de tri des cytomètres en flux est de plus en plus évoluée comme on peut le voir avec le FACS utilisé dans notre étude, qui permet de trier des sous-populations de cellules fluorescentes.

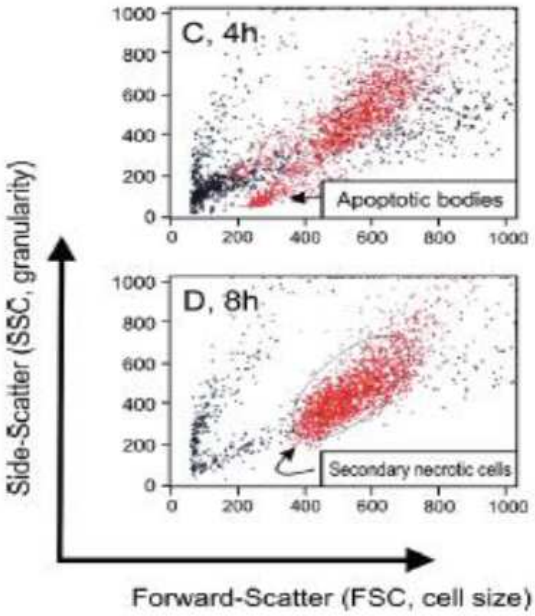



**Figure 34 : exemple de cytogramme obtenu par cytométrie en flux lors d'une étude de la mort cellulaire (Larbret, 2011)**
*Lors de notre étude, le même type de graphique a été obtenu. La population de cellules mortes est représentée ici en rouge.*

### c. Caractérisation phénotypique des CSM – le CMH-II

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les cellules stromales mésenchymateuses, en particulier celles issus de tissus fœtaux, présentent un « immunoprivilège » leur conférant un faible risque de rejet lors d'injection allogénique. Le mécanisme de cet immunoprivilège n'est pas bien élucidé, néanmoins, la première hypothèse est qu'il provient d'une faible expression des CMH-I et CMH-II par les CSM (Liu, 2012).

En effet, l'expression des gènes du CMH-II est strictement régulée et restreinte dans la plupart des situations physiologiques à quelques types cellulaires hautement spécialisés :

- cellules présentatrices de l'antigène professionnelles = cellules dendritiques
- cellules B
- cellules T activées
- compartiment cellulaire du thymus (sélection positive)
- leur expression peut être augmentée par l'IFN γ.

Or, bien que certaines études montrent que des CSM expriment le CMH-II, le mécanisme qui en détermine ou non l'expression reste obscur. Par exemple, des études ont montré que le CMH-II était exprimé par des CSM au cours de leur différenciation en cellules neuronales et de manière inconstante par des CSM après cryoconservation (Liu, 2012). A l'inverse, Le Blanc *et al.* (2003) a montré que le CMH-II n'était pas exprimé lors de la différenciation des CSM en ostéocytes,

adipocytes ou chondrocytes. Sans oublier l'étude de Schnabel *et al.* (2013) précédemment évoquée, qui démontre que 90% de leurs CSM issues de chevaux adultes en culture précoce expriment le CMH-II.

Ainsi, il s'avère très intéressant dans notre étude de mesurer l'expression du CMH-II afin de contribuer à la compréhension de l'expression du CMH-II dans les CSM.

Pour ce faire, les CSM vont être mises en présence d'anticorps anti-CMH-II équin marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (CMH2-FITC - AbD Serotec, # MCA1086F) et passées en cytomètre de flux (FACS) selon le protocole suivant :

- Diluer la solution d'anticorps initiale (1mg/mL) au 50ème
- Récupération des cellules en tube de contenance adaptée
- Ajout d'un volume de PBS correspondant au volume de la solution de CSM récupérée
- Centrifugation 2min30s à 150G
- Elimination du surnageant
- Reprise du culot cellulaire dans 300µL de PBS
- Centrifugation 2min30s à 150G
- Elimination du surnagent
- Ajout de 30µL de solution anticorps à chaque culot cellulaire
- Laisser 20 min à 4°C à l'abri de la lumière
- Centrifugation 2min30s à 150G
- Elimination du surnageant
- Reprise du culot cellulaire dans 300µL de PBS
- Centrifugation 2min30s à 150G
- Elimination du surnagent
- Reprise du culot cellulaire dans 150µL de PBS
- Protection des tubes de la lumière avant le passage sur FACS

### 3. Cellules stromales mésenchymateuses en suspension

- **Matériel :**

On utilise un échantillon du LS pathologique numéro 6 de notre groupe (jument Trotteuse française de 2 ans – tarse droit). Pour étudier une éventuelle différence de réaction des cellules stromales mésenchymateuses entre un LS sain et un LS pathologique, nous prenons également un échantillon dans notre banque de liquides synoviaux sains (Vaquero – boulet antérieur droit).

Un aliquote de CSM congelé dans l'azote liquide ainsi que 4 plaques 96 puits à fond plat non traitées sont utilisées afin d'éviter que les cellules stromales adhèrent.

Le milieu de culture utilisé durant cette manipulation préliminaire est le milieu minimum essentiel de Eagle (EMEM) auquel sont ajoutés du sérum de veau fœtal (10%), de la glutamine (acide aminé essentiel très instable) et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

L'HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique) ajouté au milieu de culture en début de manipulation est un système tampon organique utilisé dans de nombreuses réactions biochimiques et dans certains milieux de culture cellulaire (pKa = 7,3). L'hepes n'a pas de bénéfice nutritionnel pour les cellules mais il permet de les préserver même pendant des périodes de manipulation en-dehors d'un incubateur (Good, 1966).

La solution d'IP dilué au 10000$^{ème}$ dans du PBS est préparée extemporanément.

- **Méthode :**

La veille de la manipulation, l'aliquote de cellules stromales sélectionné est placé à 37°C avec 5% de $CO_2$. Une fois décongelées, les cellules sont centrifugées puis décomptées en cellule de Malassez après coloration au Bleu Trypan (annexe 6). On dénombre 6 millions de cellules stromales mésenchymateuses vivantes. Ces dernières sont mises en culture pour la nuit en flasque avec du milieu de culture EMEM et de l'hepes à 0,01M. Au matin du jour de manipulation, un nouveau décompte des CSM en culture montre une viabilité inférieure à 50% ce qui est trop peu pour travailler. En effet, nous allons réaliser les essais de cette manipulation en doublon, ce qui nous amène à ensemencer 80 puits (fig 35). Il est nécessaire d'avoisiner 80000 à 100000 CSM par puit pour pouvoir réaliser les tests de ce protocole, ainsi nous devons commencer la manipulation avec 6 à 8 millions de CSM viables. Trois autres aliquots de CSM conservés dans l'azote liquide sont décongelés un par un et le troisième uniquement contient un nombre approchant de CSM nécessaire à notre manipulation (6 millions) avec une viabilité de 60% environ (viabilité à T0 estimée par marquage IP et passage sur FACS). Bien que ces cellules n'aient pas bénéficié d'une nuit de culture nécessaire à leur stabilisation, et que le nombre de CSM ne soit pas entièrement satisfaisant, nous décidons de commencer la manipulation.

Les liquides synoviaux sont dilués dans du milieu de culture EMEM. Sur la base de la littérature, on choisit de travailler avec 5 dilutions:

1- Absence de LS (témoin négatif)
2- 10% de LS
3- 20% de LS

4- 50% de LS

5- 100% de LS

Les CSM décongelées sont réparties de manière homogène dans 5 tubes Eppendorf©. Chaque aliquote de cellules ainsi constitué est mis en suspension dans une des 5 dilutions de LS. 180µL de ces suspensions cellulaires sont déposés dans les cupules des microplaques comme détaillé dans la figure 35 (cela correspond à environ 72 000 CSM par puit). Les 4 microplaques sont ensuite mises à incuber à 37°C avec 5% de $CO_2$.

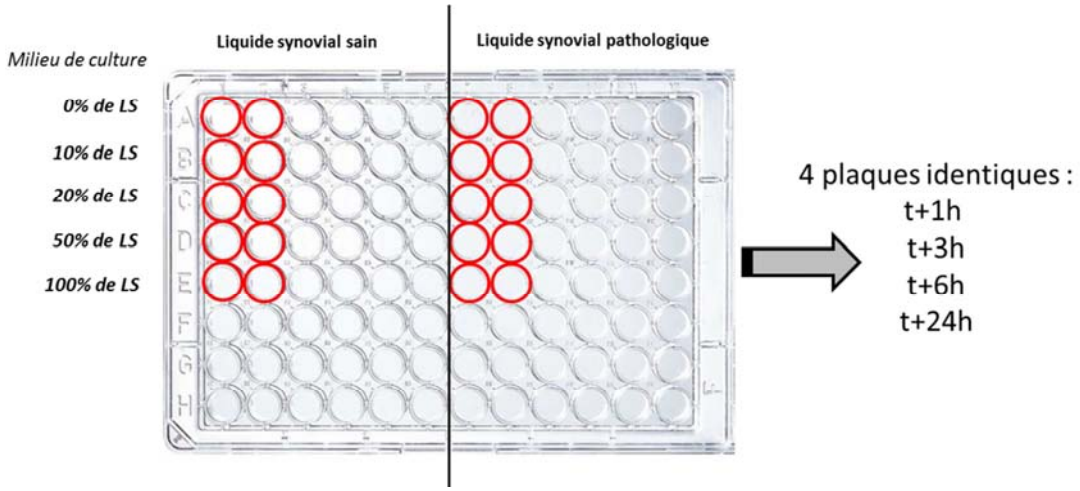
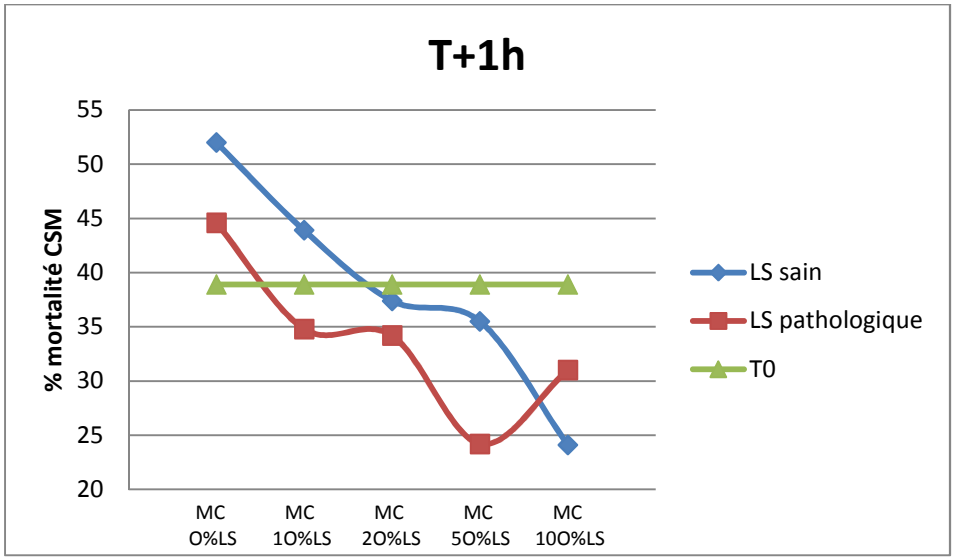


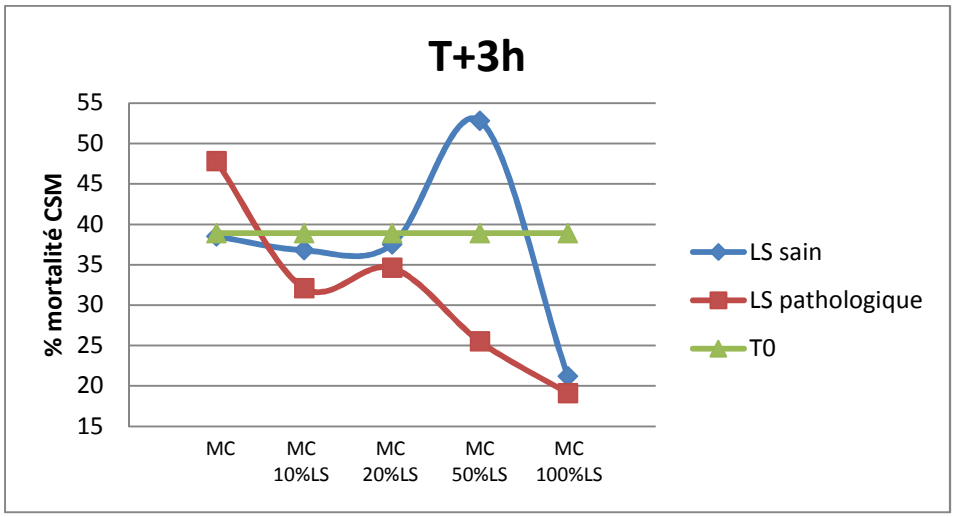

Figure 35 : plan de plaque pour l'étude préliminaire des CSM en suspension

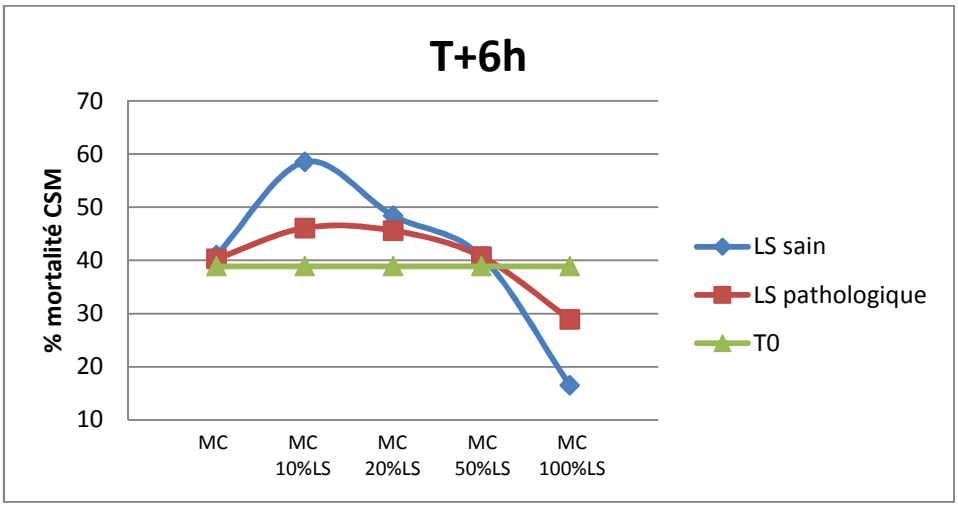
Les 4 microplaques sont traitées à 4 temps différents :

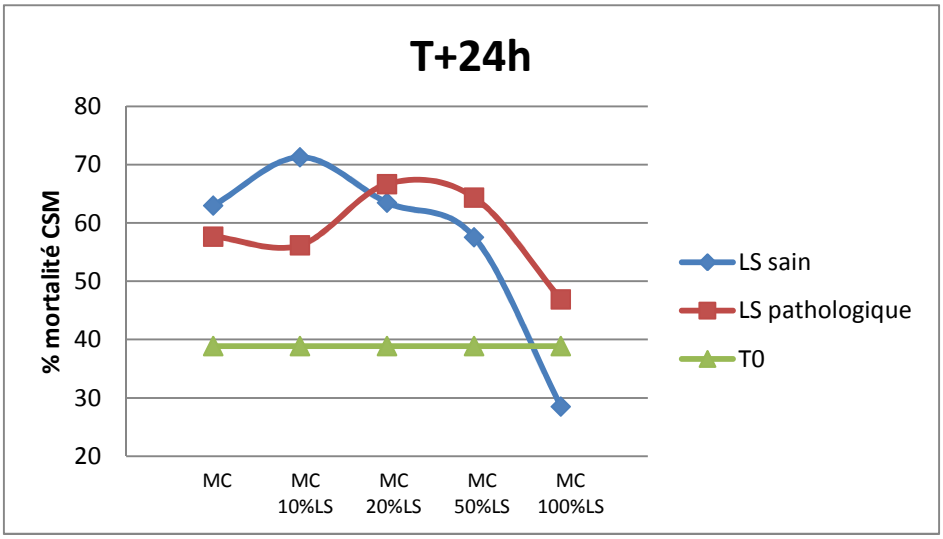
- A t+1h, on réalise un marquage IP
- A t+3h, on réalise un marquage IP et un marquage CMH-II
- A t+6h, on réalise un marquage IP
- A t+24h, on réalise un marquage IP. Le marquage CMH-II initialement prévu ne peut être réalisé du fait d'un nombre de CSM trop faible.

- **Résultats :**


T+1h
% mortalité CSM
55
50
45
40
35
30
25
20
MC 0%LS
MC 10%LS
MC 20%LS
MC 50%LS
MC 100%LS
LS sain
LS pathologique
T0


T+3h
% mortalité CSM
55
50
45
40
35
30
25
20
15
MC
MC 10%LS
MC 20%LS
MC 50%LS
MC 100%LS
LS sain
LS pathologique
T0


T+6h
% mortalité CSM
70
60
50
40
30
20
10
MC
MC 10%LS
MC 20%LS
MC 50%LS
MC 100%LS
LS sain
LS pathologique
T0




En outre, le CMH-II n'est pas exprimé à t+3h.

- **Discussion :**

Tout d'abord, nous remarquons que la mortalité des CSM est globalement élevée, et ce dès le temps t0. Plusieurs hypothèses peuvent être émises à ce sujet comme une technique de prélèvement des CSM à partir du cordon ombilical peu performante, un temps prolongé de conservation des CSM dans l'azote liquide, une décongélation rapide sans mise en culture des CSM plusieurs heures avant de les manipuler ou une mauvaise technique de manipulation durant l'essai. La toxicité du LS ou des plaques 96 puits pour les CSM peut également être envisagée, cependant, les mortalités sont également élevées pour les CSM en suspension uniquement dans du milieu de culture. L'hypothèse la plus probable reste une mauvaise méthode de congélation ayant entraîné une forte mortalité cellulaire.

Ensuite, les pourcentages de mortalité augmentent rapidement au fil des heures à tel point qu'il ne reste plus suffisamment de CSM vivantes à t+24h pour réaliser un marquage CMH-II. Là-encore, il est difficile de dégager les causes exactes de cette mortalité. En effet, elle peut venir des CSM elles-mêmes, mais également d'une intolérance à la plaque utilisée qui ne permet par leur adhérence, ou encore à une mauvaise manipulation des CSM.

En outre, nous notons que dans l'ensemble de nos résultats, il n'y a pas beaucoup de différence de viabilité des CSM dans le LS sain et dans le LS pathologique. Cela est aussi vrai pour les concentrations croissantes de LS qui ne semblent pas avoir d'effet marqué sur la viabilité des CSM. Il est cependant difficile de juger de ces résultats car d'une part nous n'avons qu'une unique valeur de mortalité pour chaque situation, et d'autre part, il y un faible nombre de CSM vivantes subsistant au

fil des heures. De plus, les résultats obtenus avec une concentration de LS de 100%, sont peu interprétables. En effet, bien que cette concentration soit la plus représentative des conditions réelles d'utilisation des CSM en intra-articulaire, l'histogramme obtenu lors du passage sur le FACS du marquage IP comporte deux pics, le premier étant inexpliqué. On peut ainsi se demander si le LS à cette concentration et sans prétraitement ne contiendrait pas des molécules interférant avec le marquage IP.

### 4. Cellules stromales mésenchymateuses en adhérence

Comme nous l'expliquions au début de notre étude préliminaire, placer les CSM en suspension afin d'étudier leur comportement au plus près des conditions réelles d'utilisation constitue un protocole très peu documenté. Ainsi, il est intéressant de comparer la méthode mise en œuvre sur les CSM en suspension à des CSM en adhérence qui constitue leur mode de culture classique.

- **Matériel :**

Les échantillons de liquides synoviaux sain et pathologique utilisés sont issus des mêmes animaux que dans l'étude en suspension, à savoir : le LS pathologique numéro 6 de notre groupe (jument Trotteuse française de 2 ans – tarse droit) et le LS sain Vaquero – boulet antérieur droit.

Un aliquote de CSM congelé dans l'azote liquide ainsi que 4 plaques transparentes 12 puits traitées pour la culture cellulaire sont utilisés.

Le milieu de culture utilisé durant cette manipulation préliminaire est le même milieu minimum essentiel de Eagle (EMEM) auquel sont ajoutés du sérum de veau fœtal (10%), de la glutamine (acide aminé essentiel très instable) et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

La solution d'IP dilué au 10000$^{ème}$ dans du PBS est préparée extemporanément.

- **Méthode :**

La veille de la manipulation, l'aliquote de cellules stromales sélectionné est placé à 37°C avec 5% de $CO_2$. Une fois décongelées, les cellules sont mises en culture sur une plaque transparente 12 puits traitée pour la culture cellulaire avec du milieu de culture EMEM et mises à incuber à 37°C avec 5% de $CO_2$. Le lendemain, les CSM étant à confluence et d'aspect normal, elles sont passées sur 3 plaques transparentes 12 puits traitées pour la culture cellulaire en ensemençant 8 puits sur chaque plaque. Les 3 plaques sont mises à incuber à 37°C avec 5% de $CO_2$. Le lendemain, peu de CSM ont

adhéré dans les puits, celles qui ont adhéré sont d'aspect normal. On note la présence d'amas de CSM en suspension.

Les liquides synoviaux sont dilués dans du milieu de culture EMEM à l'image du protocole des CSM en suspension décrit précédemment. La seule différence réside dans la concentration de LS 100% qui est abandonnée ici du fait des résultats non exploitables de la manipulation des CSM en suspension.

Le milieu de culture présent dans les 8 puits des 3 plaques est remplacé par 500µL d'une des dilutions de LS comme détaillé dans la figure 36. Les 3 plaques sont ensuite mises à incuber à 37°C avec 5% de $CO_2$.

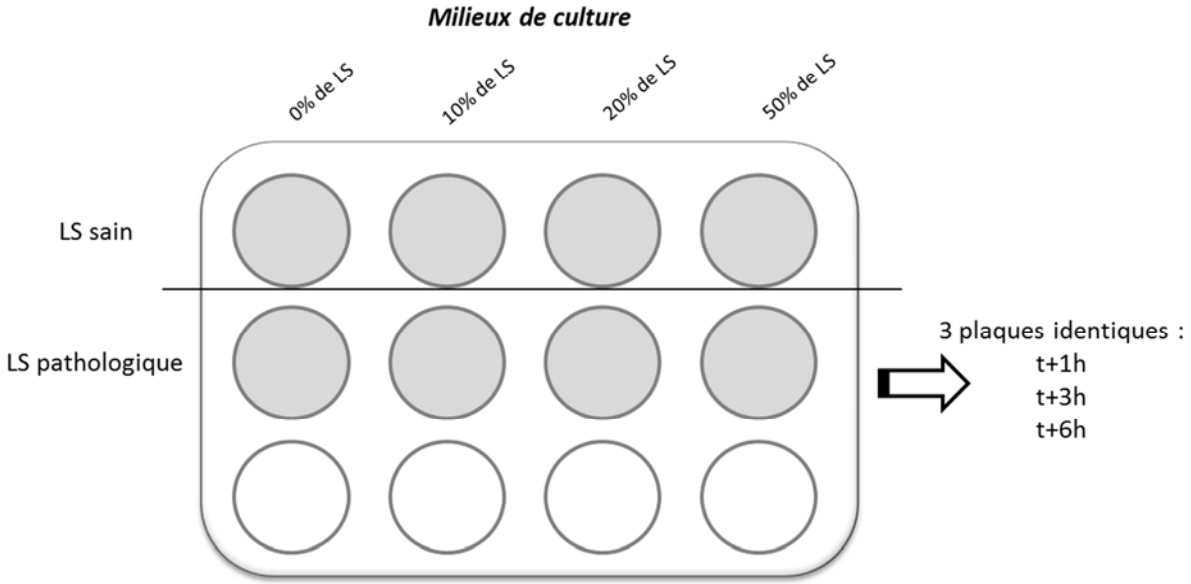


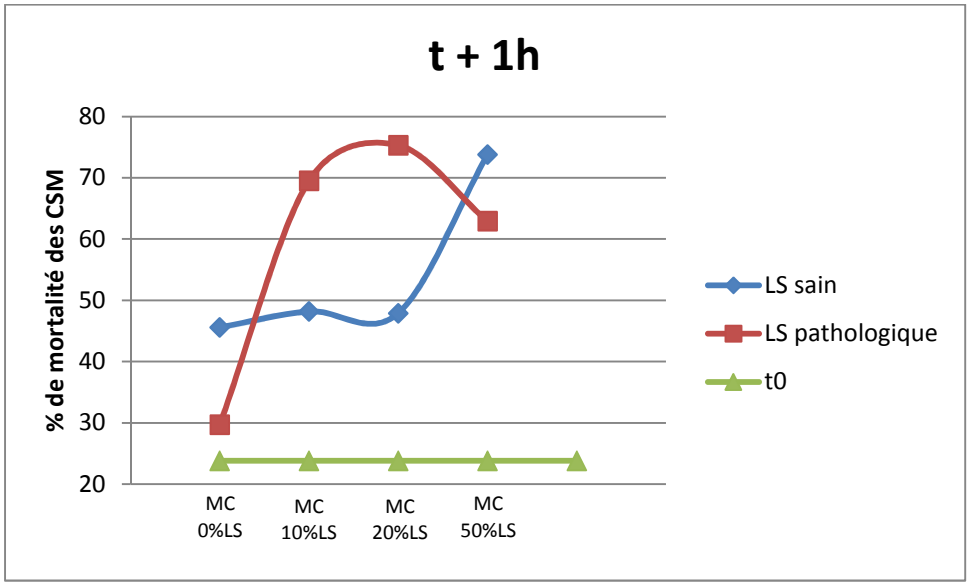

Figure 36 : plan de plaque pour l'étude préliminaire des CSM en adhérence

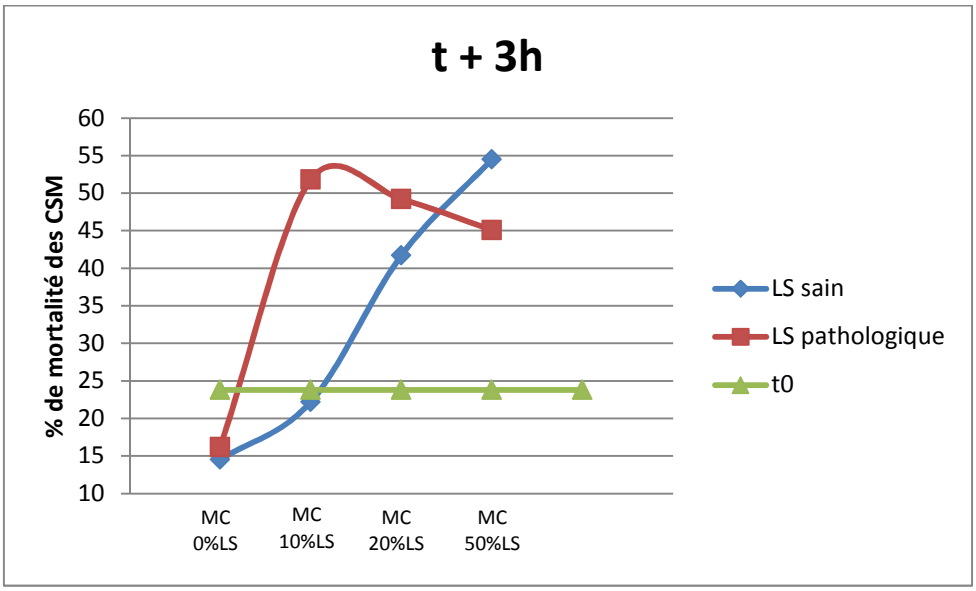
Les 3 microplaques devaient être traitées à 3 temps différents :

- A t+1h, un marquage IP est réalisé
- A t+3h, on réalise un marquage IP et un marquage CMH-II devait être effectué
- A t+6h, on réalise un marquage IP
- Le temps t+24h est abandonné du fait des résultats peu satisfaisants concernant la mortalité des CSM en suspension. De plus, ce temps a moins d'intérêt pour nous car dans la pratique, les CSM ne sont plus détectables quelques heures après l'injection intra articulaire (Bourzac, 2009).

Cependant, devant le peu de CSM vivantes à t+3h, les puits des plaques t+3h et t+6h ont été poolés afin de réaliser le marquage IP.

- **Résultats :**




- **Discussion :**

Nous pouvons à nouveau noter un pourcentage de mortalité globalement élevé bien que dans cette manipulation, la mortalité à t0 soit plus acceptable (23%). Les CSM n'étaient pas dans un état optimal en début de manipulation (peu de CSM adhérentes) et les mêmes pistes de réponse que pour les CSM en suspension peuvent être évoquées.

A t+3h, on peut voir que l'on a une mortalité des CSM en LS sain qui semble croître assez régulièrement au fil de l'augmentation des concentrations en LS : plus la concentration en LS est élevée, plus les CSM meurent. Cela irait dans le sens d'une intolérance des CSM à certains composés

ou à certaines caractéristiques physiques du LS. Il est néanmoins difficile d'expliquer que le taux de mortalité pour les deux premières concentrations de LS sain soit en-dessous du t0.

Toutefois, nous rappelons une nouvelle fois que les résultats obtenus sont à prendre avec précaution du fait que nous n'avons d'une part qu'une unique valeur de mortalité pour chaque situation, et d'autre part, qu'il y un faible nombre de CSM vivantes subsistant au fil des heures.

#### 5. Bilan des manipulations préliminaires

Le bilan de ces études préliminaires est mitigé. En effet, concernant l'effet de la mise en suspension des CSM, la viabilité semble globalement meilleure en comparaison aux CSM en adhérence, mais les chiffres sont à prendre avec précaution et l'étude a soulevé de nombreuses questions. Néanmoins, la mise en suspension est la méthode qui se rapproche le plus des conditions réelles d'utilisation *in vivo.* Le temps et les CSM manquent pour réitérer ces manipulations afin d'avoir des résultats plus probants.

De plus, nous avons pu remarquer que les CSM survivaient mieux sur des temps courts, à l'image de ce qu'il se passe *in vivo.* Nous garderons donc par la suite les temps t+1h, t+3h et t+6h.

Par ailleurs, comme nous l'avons expliqué précédemment, la stimulation des CSM avant leur utilisation thérapeutique permet d'orienter leur profil sécrétoire. Il s'agit donc maintenant de savoir à partir de quelle concentration de LS et à partir de quelle durée (entre 0h et 6h) en présence de LS les CSM sont suffisamment stimulées pour remplir au mieux leur rôle anti-inflammatoire. Dans cette optique, il est également nécessaire de caractériser les LS. En effet, bien que les LS soient soit sains soit issus de chevaux atteints d'ostéochondrose, leur profil inflammatoire est intéressant à déterminer afin d'évaluer leur éventuelle influence sur les CSM. Cela nécessite donc de réaliser d'une part une étude cinétique et d'autre part des étapes de caractérisation des LS que nous allons décrire maintenant.

### C. Etude cinétique

#### 1. Prérequis

##### a. La PCR quantitative

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence

d'ADN choisie. En pratique, il faut commencer par déterminer les amorces d'ADN conçues pour se lier au début et à la fin de la cible d'ADN. Ensuite, la matrice d'ADN contenant la cible est ajoutée à un tube contenant les amorces, des nucléotides libres et une enzyme, l'ADN polymérase. Le mélange est placé dans un automate qui réalise la PCR. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute) (Asensio, 2007).

Pour ce qui est de la PCR quantitative ou en temps réel, son principe repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR en point final). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (ex : Technologie SYBR, ce qui est le cas dans notre étude), soit sur une séquence d'ADN précise (ex : Technologies Taqman et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN. La mesure de la fluorescence permet de déterminer "en temps réel" si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent –et donc amplifié –sans avoir besoin de faire une électrophorèse par exemple. De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR. La quantité d'amplicons étant corrélée à la quantité initiale d'ADN de la matrice originale, on peut quantifier la matrice originale (Poitras, 2002).

### b. Les gènes de ménage

Dans une PCR, un gène de ménage ou housekeeping (HK) permet de normaliser la méthode par rapport à une référence biologique et ainsi d'obtenir des résultats pertinents. Les gènes de ménage sont un groupe de gènes qui codent pour des protéines dont la fonction est essentielle à la viabilité de la cellule. Il est généralement présumé que ces gènes ont une expression ubiquitaire, stable entre les différents tissus, entre les individus, et quelles que soient les conditions expérimentales. L'utilisation de ce contrôle endogène permet, en théorie, de contrôler toutes les étapes du protocole expérimental, son expression reflétant non seulement la quantité et la qualité de l'ARN utilisé, mais aussi les efficacités de la RT et de la PCR (Jain, 2006).

## 2. Choix des molécules et élaboration des amorces

L'étude cinétique vise à déterminer à quelle concentration de LS et au bout de combien de temps les CSM modifient leur profil sécrétoire. Il existe un très grand nombre de molécules sécrétées par les CSM en milieu inflammatoire et nous devons choisir un nombre restreint de molécules qui seront recherchées grâce à des PCR quantitatives. Aucune étude n'a porté sur un classement pertinent des molécules pouvant être recherchées dans un cadre se rapprochant de celui de notre étude. Ce travail se place donc dans un cadre préliminaire.

En se basant sur la littérature, nous choisirons de rechercher deux molécules fortement pro-inflammatoires : le TNF-α et l'IL1-β ainsi que 2 molécules immunomodulatrices : l'IL1-Ra et IDO. Nous prendrons le gène UBQ en tant que gène de ménage.

Nous élaborons et vérifions les amorces grâces au site NCBI (« NCBI » -> « BLAST » -> « Primer-BLAST »), en cherchant à s'appuyer sur des publications pertinentes. Les informations portant sur les amorces employées sont résumées dans l'annexe 3.

## 3. Etude cinétique : première partie

### a. Matériel

Deux aliquotes de CSM sont sortis de l'azote liquide et mis en culture pendant environ 10 jours. Deux passages sont effectués durant ces dix jours.

Afin d'inclure dans l'étude un témoin fortement inflammatoire, nous diluons de l'IL1β au 10000$^{ème}$ dans du milieu de culture.

Dans le but d'économiser les LS entrant dans notre étude, nous utilisons un autre échantillon de LS pathologique : le numéro 16 de notre banque (hongre Trotteur Français de 1 an et demi prélevé lors de sa chirurgie pour OCD compliquée du tarse droit). Pour notre témoin sain, nous prenons un échantillon du LS de Vaquero – jarret postérieur droit.

Nous allons travailler en suspension, nous utiliserons donc 3 plaques 96 puits à fond plat non traitées pour la culture cellulaire.

### b. Méthode

Dans leurs flasques de culture, les CSM sont presque à confluence et ont un aspect normal. Elles sont récupérées, poolées et comptées en cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan (annexe 6). On dénombre 28 millions de CSM.

Les liquides synoviaux sont dilués dans du milieu de culture EMEM. La manipulation étant longue et compliquée, nous choisissons de travailler avec 3 des 5 concentrations de la première étude :

1- Absence de LS (contrôle négatif)
2- 20% de LS
3- 50% de LS
4- 100% de LS

Les CSM sont réparties équitablement dans 8 tubes Eppendorf© contenant donc chacun environ 3,5 millions de CSM. Chaque aliquote de cellules ainsi constitué est mis en suspension dans une des 4 dilutions de LS sain ou pathologique. Le dernier tube est mis en suspension dans l'IL1β dilué au 10000$^{ème}$. 200µL de ces suspensions cellulaires sont déposés dans les cupules des microplaques comme détaillé dans la figure 37. Les 3 microplaques sont ensuite mises à incuber à 37°C avec 5% de $CO_2$.

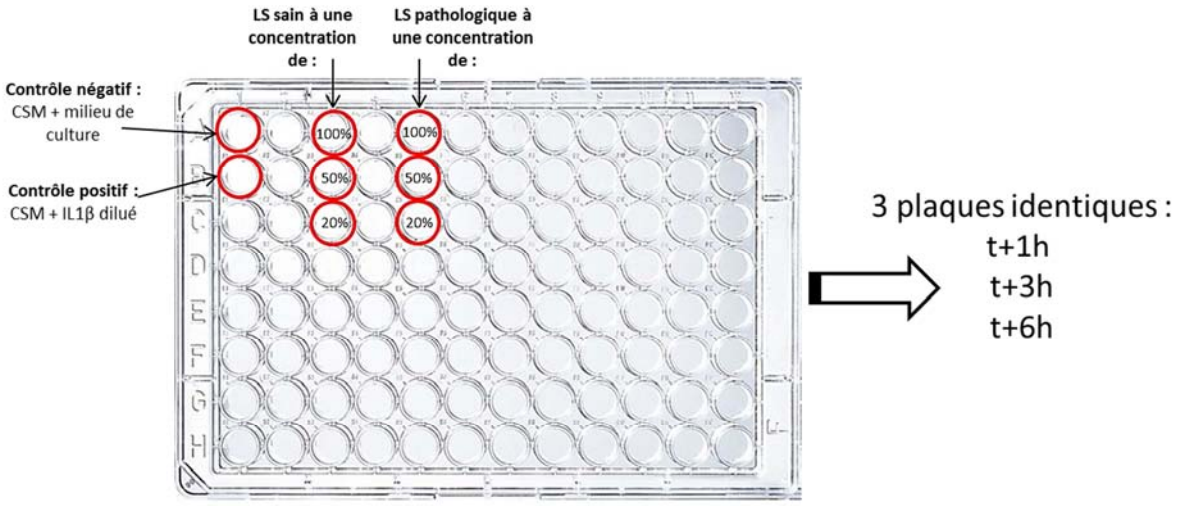



Figure 37 : plan de plaque de la première partie de l'étude cinétique

A chaque temps (t+1h, t+3h et t+6h), le contenu des puits est récupéré et placé dans des tubes Eppendorf© correctement identifiés. Après centrifugation 5 min à 0,3 rcf, les culots cellulaires sont mis en suspension dans 300µL de tampon de lyse puis stockés dans les 5 minutes à -80°C.

## 4. Réalisation de la PCR quantitative

### a. Extraction d'ARN

Avant de réaliser notre PCR à proprement parlé, il est nécessaire d'extraire l'ARN de nos CSM qui contient les gènes que nous recherchons. Pour cela, nous allons utiliser le kit Perfect Pure RNA Cell & Tissue de Prime 5©.

Les 24 tubes de l'étude sont traités selon la méthode détaillée en annexe 4.

### b. Dosage de l'ARN par spectrophotométrie

Un spectrophotomètre utilise la transmission de la lumière à travers une solution pour déterminer la concentration d'un soluté à l'intérieur de la solution. L'appareil fonctionne suivant un principe simple dans lequel de la lumière d'une longueur d'onde connue traverse un échantillon et où la quantité d'énergie lumineuse transmise est mesurée à l'aide d'une cellule photoélectrique placée de l'autre côté de l'échantillon. Comme le montre la figure 38, la conception du spectrophotomètre à simple faisceau implique l'utilisation d'une source lumineuse (ici la lumière ultraviolette), d'un prisme, d'un support d'échantillon et d'une cellule photoélectrique (Somma, 2006).

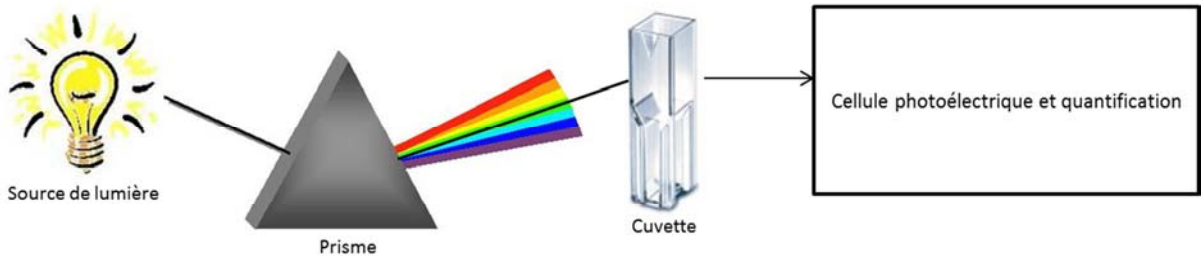



Figure 38 : représentation schématique de la transmission lumineuse (d'après Somma, 2006)

Toutes les molécules absorbent de l'énergie radiante à une longueur d'onde spécifique à partir de laquelle il est possible d'extrapoler la concentration d'un soluté à l'intérieur d'une solution. Selon la loi de Beer-Lambert, il existe une relation linéaire entre l'absorption A (également appelée densité optique, DO) et la concentration de la macromolécule qui est donnée par l'équation suivante : $A = DO = \varepsilon lc$ où $\varepsilon$ est égal au coefficient d'extinction molaire, c indique la concentration et l représente la longueur de parcours de la cuvette (Somma, 2006).

Les spectres d'absorption des acides nucléiques présentent une bande d'absorption maximale autour de 260 nm. On mesure donc généralement la concentration d'acides nucléiques par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé « blanc » (Somma, 2006).

Les 24 échantillons de notre manipulation sont dilués au 10ème avec un volume final de 50µL. On obtient ainsi les quantités d'ARN résumées dans le tableau suivant.

**Tableau VIII : résultats des dosages de l'ARN par spectrophotométrie**

| | Echantillons | DO mesurée (260 nm) | Concentration ARN (ng/µL) | Quantité totale échantillon (µg) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | T+1h contrôle - | 0,597 | 238,8 | 11,9 |
| 2 | T+1h contrôle + | 0,517 | 206,8 | 10,3 |
| 3 | T+1h LSs 100% | 0,525 | 210 | 10,5 |
| 4 | T+1h LSs 50% | 0,436 | 174,4 | 8,7 |
| 5 | T+1h LSs 20% | 0,416 | 166,4 | 8,3 |
| 6 | T+1h LSp 100% | 0,594 | 237,6 | 11,9 |
| 7 | T+1h LSp 50% | 0,431 | 172,4 | 8,6 |
| 8 | T+1h LSp 20% | 0,41 | 164 | 8,2 |
| 9 | T+3h contrôle - | 0,476 | 190,4 | 9,5 |
| 10 | T+3h contrôle + | 0,423 | 169,2 | 8,5 |
| 11 | T+3h LSs 100% | 0,404 | 161,6 | 8,1 |
| 12 | T+3h LSs 50% | 0,283 | 113,2 | 5,7 |
| 13 | T+3h LSs 20% | 0,45 | 180 | 9 |
| 14 | T+3h LSp 100% | 0,327 | 130,8 | 6,5 |
| 15 | T+3h LSp 50% | 0,178 | 71,2 | 3,6 |
| 16 | T+3h LSp 20% | 0,347 | 138,8 | 6,9 |
| 17 | T+6h contrôle - | 0,386 | 154,4 | 7,7 |
| 18 | T+6h contrôle + | 0,307 | 122,8 | 6,1 |
| 19 | T+6h LSs 100% | 0,088 | 35,2 | 1,8 |
| 20 | T+6h LSs 50% | 0,096 | 38,4 | 1,9 |
| 21 | T+6h LSs 20% | 0,183 | 73,2 | 3,7 |
| 22 | T+6h LSp 100% | 0,142 | 56,8 | 2,8 |
| 23 | T+6h LSp 50% | 0,064 | 25,6 | 1,3 |
| 24 | T+6h LSp 20% | 0,109 | 43,6 | 2,2 |

On remarque qu'à T+6h, les valeurs d'ARN dans les tubes ayant contenu du LS pathologique et dans ceux ayant contenu de fortes concentrations de LS sain sont basses. Cela révèle un faible nombre de CSM présentent dans ces tubes. Ces résultats sont donc cohérents avec nos résultats précédents. Néanmoins, ces faibles valeurs d'ARN rendent difficile la synthèse d'ADNc, prochaine étape de la réalisation de la PCR quantitative.

### c. Synthèse des ADNc

On constitue 19 tubes contenant chacun 500ng d'ARN, des molécules d'eau ($H_2O$) et 2µL d'enzymes capables de réaliser la synthèse de l'ADN complémentaire (ou ADNc) correspondant à l'ARN extrait précédemment (tab IX). On utilise un kit Takara© contenant les molécules d'eau et les enzymes. Les tubes ainsi constitués sont placés dans un thermocycleur et subissent le cycle suivant : 30°C 10min, 42°C 30min, 95°C 5min, 4°C. Une fois le cycle achevé, les tubes sont conservés à 4°C.

**Tableau IX : constitution des mélanges pour la synthèse d'ADNc**

| | Echantillons | Volume d'échantillon correspondant à 500ng d'ARN (µL) | H2O (µL) | Enzymes (µL) | Volume final (µL) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | T+1h contrôle - | 2,1 | 5,9 | 2 | 10 |
| **2** | T+1h contrôle + | 2,4 | 5,6 | 2 | 10 |
| **3** | T+1h LSs 100% | 2,4 | 5,6 | 2 | 10 |
| **4** | T+1h LSs 50% | 2,9 | 5,1 | 2 | 10 |
| **5** | T+1h LSs 20% | 3 | 5 | 2 | 10 |
| **6** | T+1h LSp 100% | 2,1 | 5,9 | 2 | 10 |
| **7** | T+1h LSp 50% | 2,9 | 5,1 | 2 | 10 |
| **8** | T+1h LSp 20% | 3 | 5 | 2 | 10 |
| **9** | T+3h contrôle - | 2,6 | 5,4 | 2 | 10 |
| **10** | T+3h contrôle + | 3 | 5 | 2 | 10 |
| **11** | T+3h LSs 100% | 3,1 | 4,9 | 2 | 10 |
| **12** | T+3h LSs 50% | 4,4 | 3,6 | 2 | 10 |
| **13** | T+3h LSs 20% | 2,8 | 5,2 | 2 | 10 |
| **14** | T+3h LSp 100% | 3,8 | 4,2 | 2 | 10 |
| **15** | T+3h LSp 50% | 7 | 1 | 2 | 10 |
| **16** | T+3h LSp 20% | 3,6 | 4,4 | 2 | 10 |
| **17** | T+6h contrôle - | 3,2 | 4,8 | 2 | 10 |
| **18** | T+6h contrôle + | 4,1 | 3,9 | 2 | 10 |
| **19** | T+6h LSs 20% | 6,8 | 1,2 | 2 | 10 |

### d. Test des amorces

Un cycle de PCR (dénaturation – hybridation – extension) peut être modulé dans ses températures ou ses durées afin de permettre une meilleure amplification. Nous allons ainsi mettre nos amorces en présence de quelques échantillons choisis d'ADNc et leur faire subir une amplification selon des durées et des températures « standards ». Cela nous permettra d'évaluer la capacité des amorces choisies à s'hybrider et à permettre une amplification des gènes d'intérêt, et si

le protocole a besoin d'être adapté ou non. Pour rappel, nous cherchons à amplifier 4 gènes d'intérêt (TNF-α, IL1-β, IL1-Ra, IDO) et 1 gène de ménage (UBQ).

Les manipulations relatives à la PCR doivent être réalisées en postes spéciaux, avec du matériel adapté à la biologie moléculaire et dans le respect des bonnes pratiques afin d'éviter toute contamination des échantillons par de l'ADN étranger. Les composants réactifs essentiels pour la PCR, en plus de l'ADN cible, sont l'eau, le tampon de réaction, une ADN polymérase thermostable, des amorces d'oligonucléotides, des désoxynucléotides (dNTP) et des ions magnésium jouant le rôle de tampon. Tous ces éléments sont rassemblés dans un mix prêt à l'emploi fourni dans le kit utilisé. Nous choisissons ensuite arbitrairement 3 échantillons d'ADNc :

- T+1h contrôle –
- T+1h contrôle +
- T+1h LSs 20%

Puisque nous avons 5 amorces à tester, nous commençons en réalisant 5 mélanges dans 5 tubes Eppendorf adaptés à la biologie moléculaire contenant chacun :

- 25µL de mix
- 11,5µL d'eau
- 0,5µL d'amorce sens
- 0,5µL d'amorce anti-sens

Nous transférons ensuite 15µL de chaque mélange dans deux microtubes. 20µL de chacun des 3 échantillons d'ADNc sont mélangés dans un tube Eppendorf afin de former un pool d'ADNc. 5µL de ce pool d'ADNc est ajouté dans chacun des 10 microtubes.

Les 10 microtubes sont ensuite placés dans un thermocycleur et subissent 40 cycles :

- préactivation réalisée une unique fois en début de premier cycle : 95°C 1 min
- 95°C 3 secondes
- 62°C 20 secondes
- 72°C 3 secondes
- un cycle de dissociation en fin de dernier cycle

### e. Résultats

Les résultats obtenus montrent que le gène de ménage UBQ est correctement amplifié. Le gène TNF-α est amplifié tardivement et possède des courbes de dissociation décalées. Les autres

gènes (IL1-β, IL1-Ra, IDO) ne sont pas amplifiés ce qui est anormal. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées telles que :

- une erreur lors des manipulations,
- des amorces inadaptées,
- des cycles ne permettant pas une expression des amorces, mais un bruit de fond serait tout de même présent,
- une mortalité trop élevée des CSM et ainsi un manque d'expression des gènes d'intérêt.

Pour tenter de trouver une explication à ces résultats, nous décidons de réaliser quelques manipulations complémentaires.

## 5. Etude cinétique : manipulations complémentaires

### a. Objectifs

Durant ces manipulations complémentaires à notre étude cinétique, nous allons étudier la mortalité des CSM ainsi que l'expression des CMH-I et CMH-II. En effet, nos études préliminaires n'ayant pas été tout à fait convaincantes, il paraît intéressant de répéter les manipulations. Cela nous permettra également d'infirmer ou non l'éventuelle mortalité trop élevée des CSM qui compromettrait la qPCR.

### b. Matériel

On utilise les mêmes liquides synoviaux que pour l'étude cinétique, c'est-à-dire :

- LS pathologique : cheval n°16 (hongre Trotteur Français de 1 an et demi prélevé lors de sa chirurgie pour OCD compliquée du tarse droit) ;
- témoin sain : Vaquero – jarret postérieur droit.

De la même façon que précédemment, on utilise aliquote de CSM congelé dans l'azote liquide, 3 plaques 96 puits à fond plat non traitées, du milieu minimum essentiel de Eagle (EMEM) auquel sont ajoutés du sérum de veau fœtal (10%), de la glutamine (acide aminé essentiel très instable), des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et de l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique) en début de manipulation.

Afin de réaliser le témoin fortement inflammatoire, nous diluons de l'IL1β au 10000$^{ème}$ dans du milieu de culture. La solution d'iodure de propidium (IP) dilué au 10000$^{ème}$ dans du PBS est préparée extemporanément.

### c. Méthode

6 jours avant la manipulation, l'aliquote de cellules stromales sélectionné est placé à 37°C avec 5% de $CO_2$. Une fois décongelées, les cellules sont mises en triple flasque avec du milieu de culture EMEM et de l'hepes à 0,01M. Le jour de la manipulation, les CSM ne sont pas à confluence, on en dénombre 6,4 millions en cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan (annexe 6).

Les liquides synoviaux sont dilués dans du milieu de culture EMEM. On travaille avec les 4 dilutions choisies précédemment :

1- Absence de LS (témoin négatif)
2- 20% de LS
3- 50% de LS
4- 100% de LS

Les CSM sont réparties équitablement dans 8 tubes Eppendorf© contenant donc chacun environ 800000 CSM. Chaque aliquote de cellules ainsi constitué est mis en suspension dans une des 4 dilutions de LS sain ou pathologique. Le dernier tube est mis en suspension dans l'IL1β dilué au 10000$^{ème}$. 100µL de ces suspensions cellulaires sont déposés dans les cupules des microplaques comme détaillé dans la figure 39. Les 3 microplaques sont ensuite mises à incuber à 37°C avec 5% de $CO_2$.

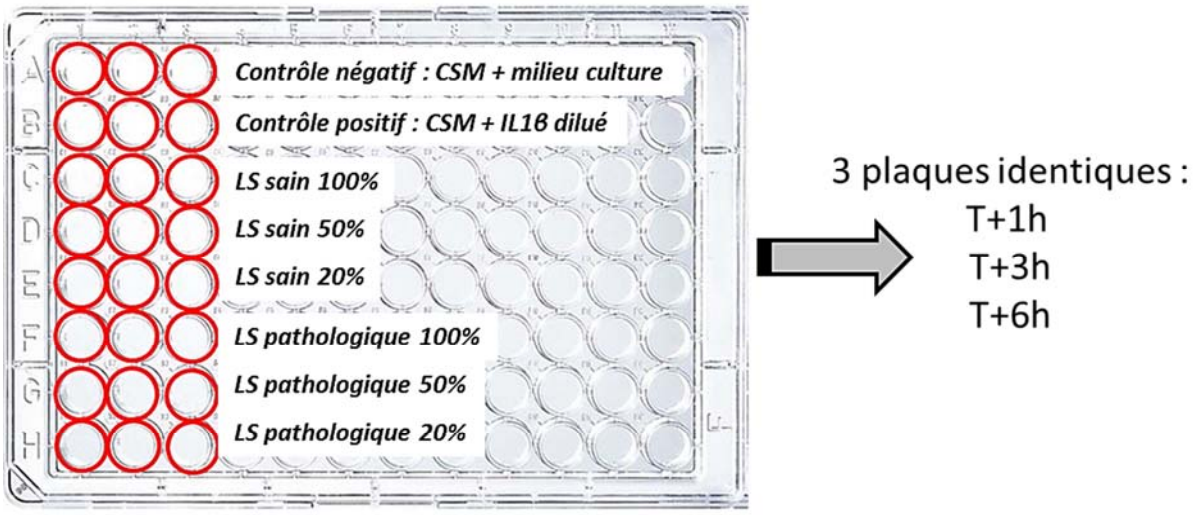



Figure 39 : plan de plaque des manipulations complémentaires de l'étude cinétique

AT+1h, T+3h et T+6h, nous devions réaliser un marquage sur chaque puits, à savoir : un marquage IP, un marquage CMH-I et un marquage CMH-II. Or, lors du marquage IP et du passage sur

FACS d'un petit aliquot de CSM juste après leur dénombrement en cellule de Malassez afin de réaliser un T0, on a 65,6% de mortalité, ce qui est beaucoup. La manipulation est alors arrêtée là.

#### d. Tentative d'explication de la mortalité des CSM

Une hypothèse qui pourrait expliquer la mort exagérée des CSM est une nocivité des plaques 96 puits utilisées. Afin d'explorer cette hypothèse, des CSM diluées dans du milieu EMEM sont déposées dans une plaque 96 puits. Un marquage IP et un passage sur FACS sont réalisés à T0, T+1h, T+3h. On obtient 6,6% de mortalité à T0, 11,7% à T+1h et 13,2% à T+3h. Ces pourcentages démontrent que les plaques utilisées n'impliquent pas une mortalité exagérée des CSM.

#### e. Bilan

Le problème de la mortalité importante des CSM devient une entrave sérieuse à l'étude que nous souhaitons mener, bien que l'idéal pour conclure sur une éventuelle mortalité lors de la qPCR aurait été de réaliser un marquage IP et un passage sur FACS au moment de l'étude cinétique et non en décalé comme c'est le cas ici. La seule cause que nous avons pu écarter avec certitude est une mortalité induite par les plaques 96 puits utilisées.

## D. Caractérisation du profil inflammatoire des LS

Nous venons de tenter d'établir un protocole pour réaliser notre étude préliminaire qui nous permettra de savoir à partir de quelle concentration de LS et à partir de quelle durée (entre 0h et 6h) en présence de LS les CSM sont suffisamment stimulées pour remplir au mieux leur rôle anti-inflammatoire. Nous allons maintenant chercher à caractériser les LS afin de pouvoir évaluer leur éventuelle influence sur les CSM.

### 1. Composition cellulaire

#### a. Technique utilisée

Du fait de la faible concentration cellulaire du LS, moins de 200 cellules/$mm^3$ (Moreno, 2000), on utilise la technique du cytospin qui permet une ultracentrifugation du LS et une concentration des cellules en une monocouche de 6mm de diamètre sur lame. La lame est ensuite colorée au May

Grünwald Giesma manuellement ou par un automate avant d'être observée sous microscope à l'immersion.

Le LS n'a jamais été passé sur cytospin après congélation à -80°C. Nous réalisons donc un test avec les deux LS suivant :

- cheval n°22 : jument Selle Français de 4 ans – tarse gauche
- cheval n°21 : jument Selle Français de 3 ans – boulet postérieur droit

#### b. Résultats

Sur les deux lames on note la présence d'un fond rose et de plusieurs croissants protéiques, signant un étalement riche en protéines, typique du LS. On peut également voir plusieurs amas de cellules éclatées, non interprétables.

#### c. Bilan

Il n'est pas possible d'interpréter la composition cellulaire du LS une fois qu'il a été congelé à -80°C. Il est nécessaire de passer les LS sur Cytospin le plus rapidement possible après leur prélèvement. De plus, un traitement à la hyaluronidase semble permettre une meilleure conservation de la morphologie cellulaire (Moreno, 2000).

### 2. Concentration en TNF-α

Comme nous l'avons vu précédemment, les cytokines inflammatoires telles que le TNF-α ou l'IL-1β jouent un rôle central dans la pathophysiologie de l'ostéoarthrose. Dans le but de caractériser le profil inflammatoire de nos LS, nous choisissons de mesurer le taux de TNF-α contenus dans chacun d'eux. Nous verrons ainsi s'il y a une différence significative entre les LS issus de chevaux atteints d'ostéoarthrose et ultérieurement si cela a une influence sur les CSM.

#### a. Principe du dosage

Nous utilisons le kit *Equine TNFα ELISA* de *Thermo Scientific* qui repose sur un dosage immuno-enzymatique en sandwich ou ELISAs. La méthode ELISA est une référence pour la quantification d'antigènes et il existe de nombreuses variantes de cette technique, dont l'ELISA sandwich fait partie. Les résultats sont rapidement obtenus et faciles à analyser.

La technique que nous utilisons pour notre dosage (fig 40) commence avec un anticorps spécifique d'une protéine d'intérêt (ici un anticorps anti-TNFα) fixé sur un support solide. Les échantillons, dont un standard contenant la protéine d'intérêt (ici des molécules de TNFα), des contrôles, et des inconnus sont déposés à la pipette dans les puits. La protéine d'intérêt est capturée par les anticorps immobilisés sur le support, un peu comme une immunoprécipitation. Après lavage, un anticorps spécifique du TNFα de cheval phosphorylé à une biotine est ajouté dans les puits et va se fixer sur les molécules de TNFα capturées. Après élimination de l'excès d'anticorps, des molécules de streptavidine-HRP sont ajoutées et viennent se lier sur la biotine des anticorps de détection avec une haute affinité. Enfin, une solution de substrat est ajoutée. Par réaction enzymatique avec la streptavidine-HRP, le substrat ajouté produit une couleur dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration de TNFα contenue dans l'échantillon. On mesure cette intensité par absorbance à 450nm et à 550nm. Les valeurs mesurées à 550nm sont retirées à celles mesurées à 450nm pour corriger les imperfections optiques dues à la plaque.

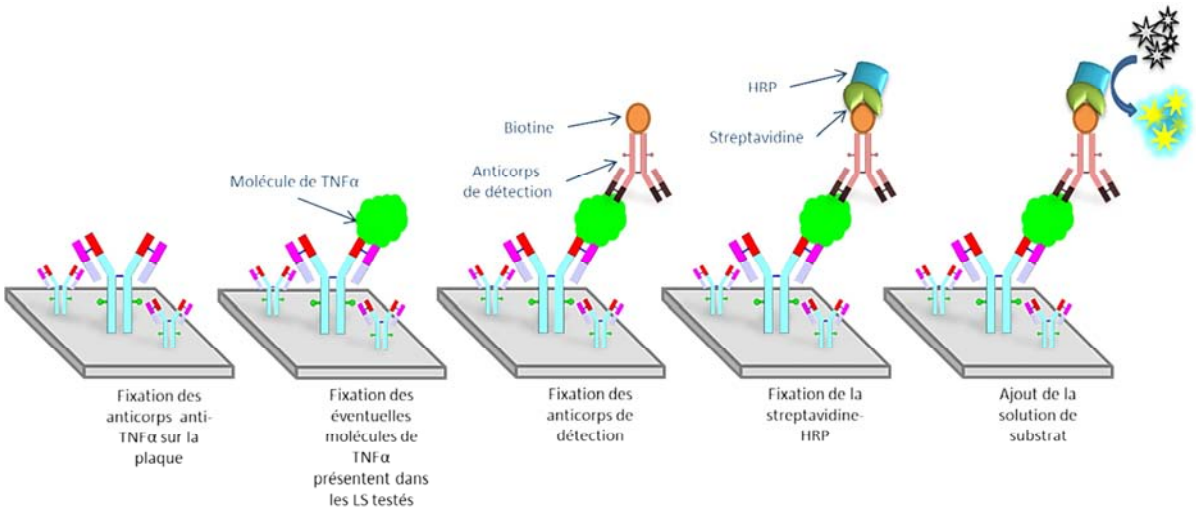



**Figure 40 : schéma de la technique ELISA sandwich utilisée pour le dosage du TNFα dans les LS (schéma personnel)**

### b. Matériel

En plus du kit *Equine TNFα ELISA* de *Thermo Scientific,* nous utilisons sur les conseils d'un technicien de *Thermo Scientific*, une plaque 96 puits à fond plat non traitée. La solution de lavage est préparée extemporanément avec 125µL de Tween 20 dilués dans 250mL de PBS modifié. Les autres réactifs sont soit contenus dans le kit, soit commandés chez *Thermo Scientific* selon les références indiqués sur le kit (annexe 5).

Nous choisissons de réaliser les dosages de TNFα sur plusieurs types de LS :

- LS sains : 1) I (Vaquero), boulet postérieur gauche

2) II (Renardo), jarret postérieur droit

- LS supposé très inflammatoire du fait de sa pathologie : cheval n°7 (hongre de 4 ans, tarse droit)
- LS pathologiques (correspondant à ceux initialement sélectionnés pour notre étude) :
    1) cheval n°2 : hongre Selle Français de 2 ans – tarse gauche
    2) cheval n°3 : hongre Selle Français de 6 ans – tarse droit & tarse gauche
    3) cheval n°11 : jument croisée Anglo-arabe de 5 ans – grasset droit
    4) cheval n°22 : jument Selle Française de 4 ans – tarse gauche
    5) cheval n°14 : jument Trotteuse française de 2 ans – tarse droit

### c. Méthode

- **Préparation de la plaque :**

✓ Diluer l'anticorps de capture au 100ème dans du tampon carbonate-bicarbonate en ajoutant 110µL d'anticorps de capture à 10,89mL de tampon carbonate-bicarbonate.

✓ Mettre 100µL d'anticorps de capture dans chaque puits. Couvrir la plaque et laisser incuber une nuit à température ambiante.

✓ Aspirer l'anticorps de capture et ajouter 300µL de tampon bloquant dans chaque puits. Couvrir la plaque et laisser incuber 1h à température ambiante.

✓ Aspirer le tampon bloquant et procéder à l'essai. La plaque peut être conservée sèche une nuit à température ambiante. Si la plaque fermée de manière hermétique, elle peut être stockée à 2-8°C pendant 6 mois.

- **Réalisation de l'essai :**

✓ Reconstituer l'étalon dans le Reagent Diluent avec le volume indiqué sur l'étiquette. La concentration de l'étalon reconstitué est de 10000pg/mL.

✓ Diluer l'étalon reconstitué au 10ème dans du Reagent Diluent afin d'obtenir la concentration maximale de l'étalon. Utiliser le Reagent Diluent pour préparer les dilutions en cascade au ½ de cette concentration maximale. Procéder de la même façon pour les échantillons à doser. Mettre 100µL de chacune des dilutions dans la plaque (fig 41). Couvrir cette dernière et laisser incuber 1h à température ambiante.

✓ Aspirer et laver trois fois avec le tampon de lavage en utilisant 300µL par puit.

- ✓ Diluer l'anticorps de détection au 100ème dans du Reagent Diluent en mélangeant 110µL d'anticorps de détection et 10,89mL de Reagent Diluent.
- ✓ Ajouter 100µL d'anticorps de détection dans chaque puit. Couvrir la plaque et laisser incuber 1h à température ambiante.
- ✓ Aspirer et laver trois fois avec du tampon de lavage en utilisant 300µL par puits.
- ✓ Diluer la streptavidine-HRP au 400ème dans du Reagent Diluent en mélangeant 30µL de streptavidine-HRP et 12mL de Reagent Diluent.
- ✓ Mettre 100µL de streptavidine-HRP ainsi diluée dans chaque puits. Couvrir et laisser incuber 30 minutes à température ambiante.
- ✓ Aspirer et laver trois fois avec du tampon de lavage en utilisant 300µL par puits.
- ✓ Mettre 100µL de solution de substrat dans chaque puits. Couvrir et laisser incuber 20 minutes à température ambiante.
- ✓ Stopper la réaction en ajoutant 100µL de Stop Solution dans chaque puits.
- ✓ Mesurer l'absorbance à 450nm et 550nm dans les 30 minutes suivant l'ajout de la Stop Solution.

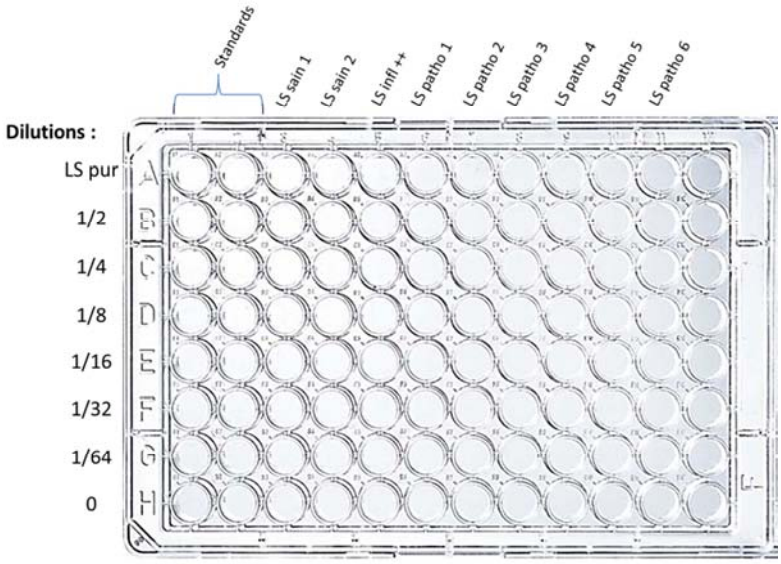



Figure 41 : plan de plaque pour le dosage du TNFα

### d. Résultats

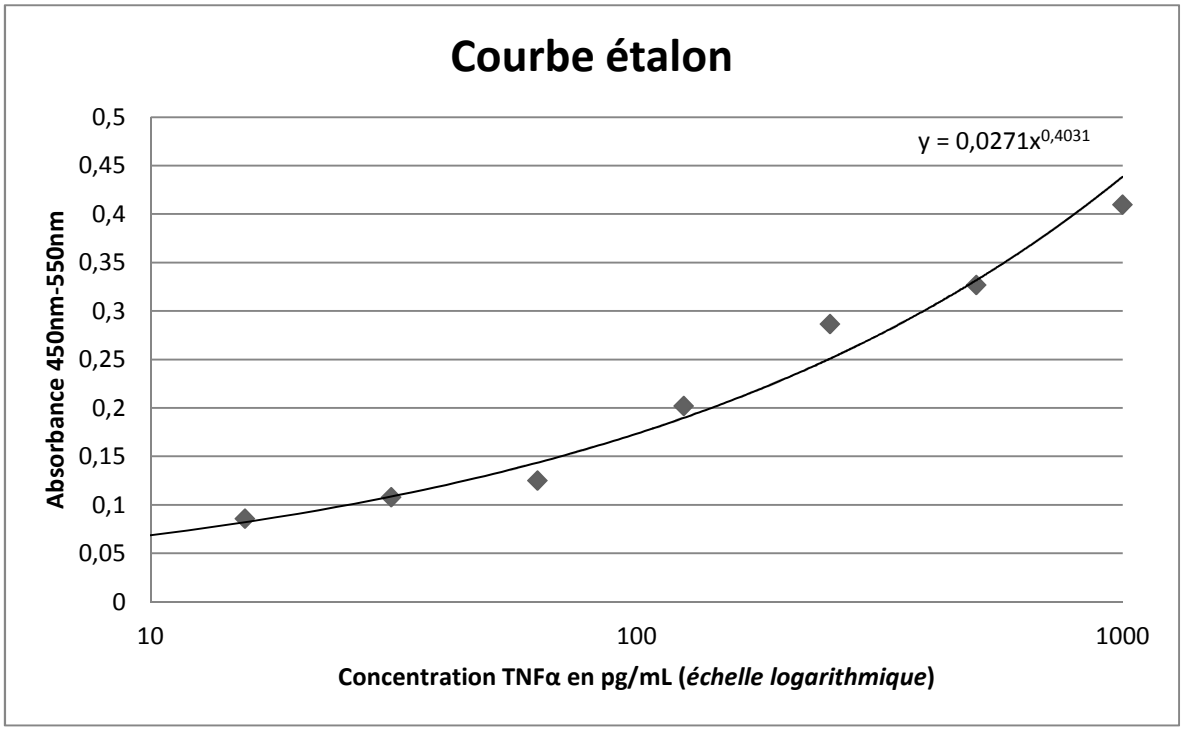
Tableau X : valeurs de DO mesurées à 450nm

| 450 nm | Standard | Standard | LSs 1 | LSs 2 | LS inf ++ | LSp 1 | LSp 2 | LSp 3 | LSp 4 | LSp 5 | LSp 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *LS pur* | 0,4431 | 0,5257 | 0,1557 | 0,1185 | 0,1716 | 0,0911 | 0,1304 | 0,1010 | 0,1365 | 0,1616 | 0,0934 |
| *1/2* | 0,3390 | 0,4552 | 0,1230 | 0,0950 | 0,1114 | 0,1132 | 0,0888 | 0,1198 | 0,1139 | 0,2367 | 0,1024 |
| *1/4* | 0,3520 | 0,3606 | 0,1278 | 0,1319 | 0,1337 | 0,1274 | 0,1427 | 0,1180 | 0,1274 | 0,1752 | 0,1332 |
| *1/8* | 0,2801 | 0,2758 | 0,1167 | 0,1216 | 0,1417 | 0,1639 | 0,1367 | 0,1412 | 0,1263 | 0,1481 | 0,1318 |
| *1/16* | 0,2059 | 0,2193 | 0,1686 | 0,1237 | 0,1317 | 0,1272 | 0,1356 | 0,0997 | 0,1219 | 0,1633 | 0,1714 |
| *1/32* | 0,1949 | 0,1814 | 0,1260 | 0,1087 | 0,1008 | 0,1188 | 0,1036 | 0,1190 | 0,1443 | 0,1326 | 0,1644 |
| *1/64* | 0,1884 | 0,1706 | 0,1025 | 0,1259 | 0,1426 | 0,1480 | 0,1376 | 0,1276 | 0,1409 | 0,1663 | 0,1427 |
| *absence de LS* | 0,2051 | 0,1554 | 0,1436 | 0,1353 | 0,1464 | 0,2758 | 0,1438 | 0,1615 | 0,1505 | 0,1546 | 0,1721 |

Tableau XI : valeurs de DO mesurées à 550nm

| 550 nm | Standard | Standard | LSs 1 | LSs 2 | LS inf ++ | LSp 1 | LSp 2 | LSp 3 | LSp 4 | LSp 5 | LSp 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *LS pur* | 0,0698 | 0,0791 | 0,0678 | 0,0746 | 0,0822 | 0,0660 | 0,0723 | 0,0667 | 0,0794 | 0,0986 | 0,0663 |
| *1/2* | 0,0687 | 0,0716 | 0,0714 | 0,0663 | 0,0665 | 0,0695 | 0,0648 | 0,0887 | 0,0680 | 0,1562 | 0,0656 |
| *1/4* | 0,0700 | 0,0689 | 0,0661 | 0,0680 | 0,0696 | 0,0719 | 0,0955 | 0,0671 | 0,0717 | 0,0953 | 0,0662 |
| *1/8* | 0,0839 | 0,0675 | 0,0677 | 0,0685 | 0,0729 | 0,0897 | 0,0742 | 0,0792 | 0,0647 | 0,0679 | 0,0658 |
| *1/16* | 0,0678 | 0,1070 | 0,0875 | 0,0686 | 0,0690 | 0,0687 | 0,0668 | 0,0660 | 0,0676 | 0,0755 | 0,0875 |
| *1/32* | 0,0820 | 0,0783 | 0,0692 | 0,0671 | 0,0667 | 0,0700 | 0,0745 | 0,0653 | 0,0832 | 0,0673 | 0,0786 |
| *1/64* | 0,1080 | 0,0790 | 0,0657 | 0,0673 | 0,0678 | 0,0672 | 0,0695 | 0,0689 | 0,0719 | 0,0697 | 0,0648 |
| *absence de LS* | 0,1621 | 0,0772 | 0,0665 | 0,0687 | 0,0689 | 0,1532 | 0,0686 | 0,0844 | 0,0709 | 0,0662 | 0,0780 |

| Moyenne standards 450nm | Moyenne standards 550nm | Différence standards 450-550nm | Concentration TNFα connues (pg/mL) |
|---|---|---|---|
| 0,4844 | 0,0745 | 0,4099 | 1000 |
| 0,3971 | 0,0702 | 0,3269 | 500 |
| 0,3563 | 0,0695 | 0,2869 | 250 |
| 0,2779 | 0,0757 | 0,2023 | 125 |
| 0,2126 | 0,0874 | 0,1252 | 62,5 |
| 0,1882 | 0,0802 | 0,108 | 31,25 |
| 0,1795 | 0,0935 | 0,086 | 15,63 |
| 0,1803 | 0,1197 | 0,0606 | 7,81 |




D'où $x = \left(\frac{y}{0{,}0271}\right)^{\frac{1}{0{,}4031}}$

Tableau XII : valeurs de DO corrigées

| 450-550nm | LSs 1 | LSs 2 | LS inf ++ | LSp 1 | LSp 2 | LSp 3 | LSp 4 | LSp 5 | LSp 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *LS pur* | 0,0879 | 0,0439 | 0,0894 | 0,0251 | 0,0581 | 0,0343 | 0,0571 | 0,0630 | 0,0271 |
| *1/2* | 0,0516 | 0,0287 | 0,0449 | 0,0437 | 0,0240 | 0,0311 | 0,0459 | 0,0805 | 0,0368 |
| *1/4* | 0,0617 | 0,0639 | 0,0641 | 0,0555 | 0,0472 | 0,0509 | 0,0557 | 0,0799 | 0,0670 |
| *1/8* | 0,0490 | 0,0531 | 0,0688 | 0,0742 | 0,0625 | 0,0620 | 0,0616 | 0,0802 | 0,0660 |
| *1/16* | 0,0811 | 0,0551 | 0,0627 | 0,0585 | 0,0688 | 0,0337 | 0,0543 | 0,0878 | 0,0839 |
| *1/32* | 0,0568 | 0,0416 | 0,0341 | 0,0488 | 0,0291 | 0,0537 | 0,0611 | 0,0653 | 0,0858 |
| *1/64* | 0,0368 | 0,0586 | 0,0748 | 0,0808 | 0,0681 | 0,0587 | 0,0690 | 0,0966 | 0,0779 |
| *absence de LS* | 0,0771 | 0,0666 | 0,0775 | 0,1226 | 0,0752 | 0,0771 | 0,0796 | 0,0884 | 0,0941 |

D'après les calculs et l'équation de la courbe étalon, on en déduit les valeurs de concentration en TNFα dans chaque échantillon :

**Tableau XIII : concentrations en TNFα dans les échantillons de LS**

| | LSs 1 | LSs 2 | LS inf ++ | LSp 1 | LSp 2 | LSp 3 | LSp 4 | LSp 5 | LSp 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *LS pur* | 0,0879 | 0,0439 | 0,0894 | 0,0251 | 0,0581 | 0,0343 | 0,0571 | 0,0630 | 0,0271 |
| *1/2* | 0,0516 | 0,0287 | 0,0449 | 0,0437 | 0,0240 | 0,0311 | 0,0459 | 0,0805 | 0,0368 |
| *1/4* | 0,0617 | 0,0639 | 0,0641 | 0,0555 | 0,0472 | 0,0509 | 0,0557 | 0,0799 | 0,0670 |
| *1/8* | 0,0490 | 0,0531 | 0,0688 | 0,0742 | 0,0625 | 0,0620 | 0,0616 | 0,0802 | 0,0660 |
| *1/16* | 0,0811 | 0,0551 | 0,0627 | 0,0585 | 0,0688 | 0,0337 | 0,0543 | 0,0878 | 0,0839 |
| *1/32* | 0,0568 | 0,0416 | 0,0341 | 0,0488 | 0,0291 | 0,0537 | 0,0611 | 0,0653 | 0,0858 |
| *1/64* | 0,0368 | 0,0586 | 0,0748 | 0,0808 | 0,0681 | 0,0587 | 0,0690 | 0,0966 | 0,0779 |
| *absence de LS* | 0,0771 | 0,0666 | 0,0775 | 0,1226 | 0,0752 | 0,0771 | 0,0796 | 0,0884 | 0,0941 |

On remarque que les absorbances mesurées pour le standard sont globalement deux fois moins élevées que celles présentées dans la notice du kit. Par ailleurs, les concentrations en TNFα dans les LS sont très basses et non cohérentes avec les dilutions croissantes.

### e. Discussion

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les résultats incohérents que nous avons obtenus :

- les anticorps de capture n'ont pas adhéré à la plaque « standard » et il serait nécessaire d'utiliser une plaque spécifique aux immunoessais.
- les LS ne contiennent pas assez de TNFα pour obtenir des résultats précis. Cependant, il n'y a pas de limite de détection mentionnées dans le kit.
- le LS contient des substances qui interfèrent avec la technique ELISA et il serait nécessaire de le prétraiter.

En ce qui concerne cette dernière hypothèse, plusieurs études démontrent l'intérêt d'un prétraitement du LS à la hyaluronidase. Effectivement, Niedhart *et al.* montrent qu'un prétraitement à la hyaluronidase, en plus d'augmenter l'homogénéité du LS, apparaît comme essentiel pour éviter des erreurs d'estimation lors du test ELISA. De plus, lors de leur étude, les auteurs indiquent qu'il n'y a pas de différence après traitement à la hyaluronidase entre des LS non centrifugés et d'autres ayant subi différentes centrifugations. On peut enfin noter que tous les LS de cette étude ont subi une congélation à -80°C avant prétraitement à la hyaluronidase, ce qui peut donc être appliqué à notre banque de LS. Dans ce sens, Yamanokuchi *et al.* ont repris le même protocole de prétraitement

à la hyaluronidase dans le but d'améliorer la spécificité et la sensibilité du dosage ELISA de la protéine oligomérique de la matrice du cartilage dans du LS de cheval issu d'articulations atteintes d'ostéoarthrose. Un autre type de prétraitement à base de chondroïtinase et de kératanases a été décrit par Catterall *et al.* et révèle de bons résultats lors de la réalisation d'un dosage ELISA sur du LS issu de genoux d'Hommes (Neidhart, 1997) (Yamanokuchi, 2009) (Catteral, 2010).

#### f. Bilan du dosage de TNFα

Le dosage du TNFα dans le LS nécessite plusieurs modifications afin d'obtenir des résultats interprétables :

- tout d'abord, nous devons utiliser des plaques 96 puits adaptées à un essai immunologique et non une plaque standard non traitée.
- les essais devront être réalisés en dupliqua à *minima* afin de limiter les risques de ne pas avoir de résultat pour un point et d'obtenir des valeurs plus précises.
- les LS devront être traités à la hyaluronidase après leur décongélation et avant le test ELISA avec par exemple, le protocole de Niedhart *et al.* qui semble prouver sa qualité : 10µL de hyaluronidase (100 unités dans 0,05M de tampon acétate de sodium, pH=5,8) pour 100µL de LS, avec une incubation de 2h à 37°C puis une conservation à -20°C jusqu'au dosage ELISA.

## II. Résultat : élaboration d'un protocole permettant de mesurer *in vitro* l'influence de la qualité du liquide synovial sur l'activité des cellules stromales mésenchymateuses

### A. Les CSM

Se référer à la partie I, chapitre IV.A pour la définition des CSM. Lors du poulinage, une partie aussi grande que possible du cordon ombilical est récupérée proprement. La gelée de Wharton est ensuite extraite du cordon. Les cellules ainsi obtenues sont mises en culture et amplifiées. Si elles ne sont pas utilisées dans l'immédiat, les CSM ainsi obtenues sont aliquotées en tubes de 1,5mL à 2mL pouvant être centrifugés et congelées dans l'azote liquide à -180°C.

Ceci n'est qu'un exemple d'obtention de CSM mis en application dans notre étude. Effectivement, on rappelle qu'il n'existe pas à ce jour de consensus concernant la manière d'isoler, d'identifier et de caractériser les CSM qui peuvent aussi provenir de fibroblastes fœtaux, du sang de cordon ombilical, du placenta ou encore du liquide amniotique.

## B. Le LS

### 1. Choix des chevaux

Le LS pathologique à étudier ainsi que le LS sain servant de référence doivent être prélevés.

Idéalement, le LS sain doit être prélevé sur des chevaux de même âge, de même race, de même sexe que les chevaux dont est issu le LS pathologique (si les écarts sont grands, il sera nécessaire de travailler *a minima* sur des classes en fonction de l'âge et du poids). L'articulation doit être également la même afin de limiter les biais d'étude. Les chevaux qui fournissent le LS sain doivent subir un examen orthopédique complet afin de déceler une éventuelle boiterie pouvant être à l'origine d'une modification qualitative du LS. Les articulations prélevées devraient également être radiographiées aussi bien chez les chevaux sains que chez les chevaux sur lesquels sont prélevés les LS pathologiques.

Attention, il est nécessaire de déposer un dossier auprès du Comité d'éthique et que ce dernier valide le protocole mis en place avant de réaliser des prélèvements de LS sur les chevaux. Si le protocole a déjà été validé, il convient de vérifier qu'il est toujours valide et si ce n'est pas le cas, de le renouveler (tous les 5 ans).

### 2. Prélèvement et conservation

- Si le prélèvement est réalisé durant une anesthésie générale à l'occasion d'une arthroscopie, la sédation et l'analgésie sont déjà assurées, il faut toutefois la noter. Si le prélèvement est réalisé sur un cheval debout vigile, alors il est nécessaire de le tranquilliser et de lui fournir une analgésie adéquate. On peut par exemple utiliser l'association detomidine 20µg/kg et butorphanol 25µg/kg.
- Tondre largement la zone et réaliser un nettoyage aseptique avec de la povidone iodée.
- Réaliser le prélèvement de manière aseptique à l'aiguille fine et à la seringue. Prélever au minimum 5,5mL de LS (cf partie II, chapitre I-A-3-b). Le LS contaminé macroscopiquement par du sang doit être écarté de l'étude (cf partie II, chapitre I-A-2-a).
- Conserver deux gouttes de LS dans la seringue et transférer stérilement le reste du LS dans des tubes de 1,5mL stériles correctement identifiés. Les tubes doivent contenir des aliquotes de LS de 1mL afin d'économiser le LS par la suite (décongélation des aliquotes). Mettre de côté un tube contenant 300µL de LS.

- Conserver avec soi la seringue de prélèvement contenant 2 gouttes de LS et le tube contenant l'aliquote de LS de 300µL. Les autres tubes doivent être placés à -80°C le plus rapidement possible.
- Réaliser un bandage propre, simple et légèrement compressif de la zone de prélèvement à maintenir pendant quelques heures minimum.
- Les chevaux prélevés doivent être maintenus en observation au box pendant 48h à 72h et les sites de ponction doivent être évalués au moins deux fois par jour afin de déceler d'éventuelles complications telles qu'une boiterie, une distension articulaire, une zone de chaleur, de douleur, un suintement… Ces complications doivent immédiatement être prises en charge.

### 3. Analyses immédiates sur place

- A partir du contenu d'un tube, apprécier la couleur et la turbidité du LS.
- A partir d'une goutte de LS restée dans la seringue de prélèvement, évaluer la viscosité du LS par le « test au doigt » : prendre une goutte de LS entre le pouce et l'index et noter à quelle distance le fil de LS se rompt lorsqu'on écarte les deux doigts.

Tableau XIV : couleur, turbidité et viscosité du LS

| LS | Normal | Inflammatoire | Purulent | Hémarthrose |
|---|---|---|---|---|
| Couleur | Jaune paille | Citrin | Blanchâtre | Rouge, rose ou brun |
| Turbidité | Transparent : on peut lire un journal à travers la seringue | Trouble | Très trouble | Trouble |
| Viscosité | Très visqueux | Peu visqueux | Variable | Très peu visqueux |

- La dernière goutte de LS de la seringue de prélèvement permet de déterminer la densité protéique du LS grâce à un refractomètre à main.

### 4. Composition cellulaire

- A réaliser le plus tôt possible après le prélèvement (maximum 24h post-prélèvement si conservation à 4°C).

- Utiliser le contenu du tube de 300µL mis à part au moment du prélèvement de LS.
- Réaliser un frottis classique sur lame à partir d'une goutte de LS.
- Ajouter ensuite deux gouttes de hyaluronidase (150 unités USP / ml) à 0,25ml de LS et centrifuger sur Cytospin© à 800 tours par minute pendant 10 min.
- Colorer les lames obtenues au May Grünwald Giesma ou avec une coloration de Wright afin de permettre l'identification des éléments cellulaires présents.
- Evaluer et noter la composition cellulaire des LS.

## 5. Caractérisation du profil inflammatoire : concentration en TNF-α

Notre étude se place dans un cadre particulier, à savoir des LS pathologiques issus d'articulations atteintes d'ostéochondrose (cf partie II, chapitre I.A.2.C) dont il est difficile d'apprécier cliniquement le stade inflammatoire. Ces LS particuliers doivent donc être caractérisés afin de faciliter les interprétations et les comparaisons des résultats ultérieurs. Cela est valable pour tous les types de LS qui pourront être étudiés avec ce protocole, il sera seulement nécessaire de choisir le dosage de l'indicateur le mieux adapté. Se référer à la partie II, chapitre I.D.2 pour les informations sur le TNF-α.

La mesure de la concentration en TNF-α est une des manipulations les plus longues de ce protocole, même en présence d'un faible nombre d'échantillons. Effectivement, cette manipulation se fait obligatoirement sur deux jours. Sans compter le temps de préparation et d'organisation et selon le nombre d'échantillons testés, il faudra compter environ 1h de manipulation à J0, suivies d'une incubation sur la nuit. Le lendemain, le travail nécessitera entre 5h et 8h de manipulation contenant environ 4h d'incubation incompressibles.

### a. Matériel

- Utiliser le kit *Equine TNFα ELISA* de *Thermo Scientific* complété de tous les réactifs ainsi que les plaques spécialement adaptées à un essai immunologique décrits dans le kit (NB : réactifs et plaques non fournis dans le kit, le kit contient : l'anticorps de capture, l'anticorps de détection, la solution étalon, la streptavidine HRP, la solution substrat, la solution stop).
- Préparer une solution de hyaluronidase (100 unités dans 0,05M de tampon acétate de sodium, pH=5,8). Le volume nécessaire de cette solution est de 80µL multiplié par le nombre d'échantillons de LS.
- Chaque échantillon de LS doit avoir un volume compris entre 900µL et 1mL.

- Les témoins négatifs sont représentés par des LS issus d'articulations saines.
- Le témoin positif est idéalement une suspension de molécules de TNF-α. Ce témoin peut également être un LS issu d'une articulation atteinte d'une pathologie très inflammatoire (pour exemple dans notre étude : LS issu d'une articulation tarso-crurale ayant subi une fracture d'avulsion, une entorse sévère ainsi qu'une subluxation médiale).
- Le poste de travail doit être propre mais ne nécessite pas forcément de travailler sous PSM.
- Une pipette multicanaux constitue un outil permettant de faciliter les manipulations et de gagner du temps dans la réalisation de ce kit.
- De nombreux tubes de 1,5mL pouvant être centrifugés seront nécessaires, notamment pour réaliser les dilutions des échantillons à tester (8 tubes par échantillon).

### b. Méthode

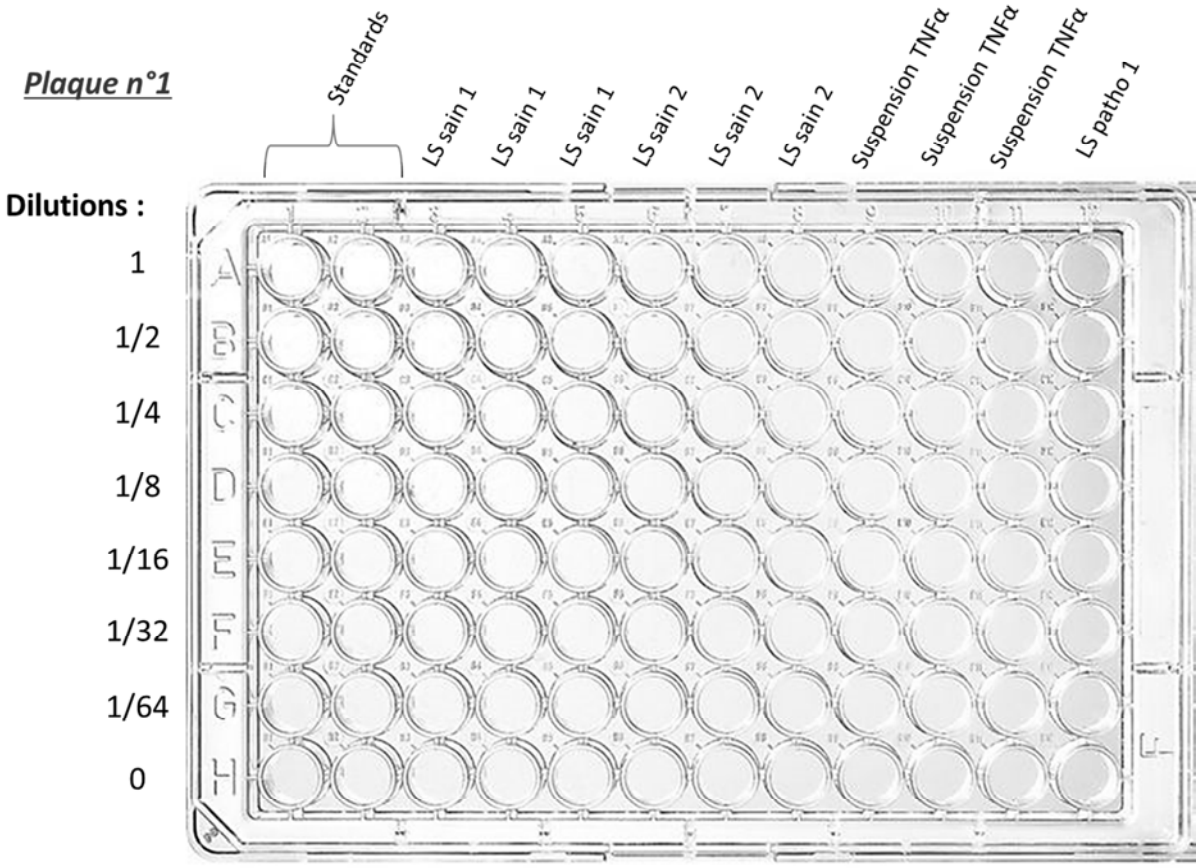
***Préparation et plan de plaque***

Il est nécessaire avant de commencer, de réfléchir étape par étape et de rassembler tout le matériel nécessaire, notamment les tubes en grand nombre nécessaires aux dilutions ainsi que les portoirs adaptés.

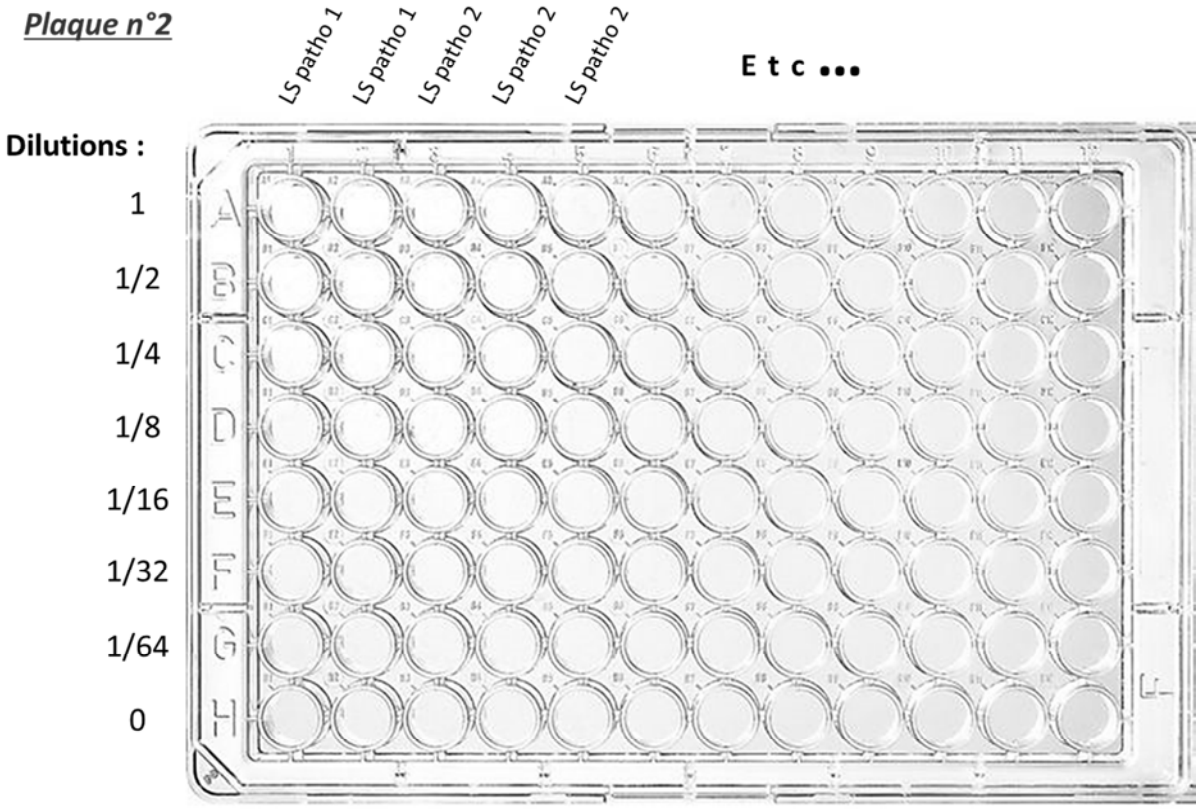
De plus, il est indispensable de dessiner un plan de plaque pour cette manipulation, d'autant plus que chaque échantillon doit être triplé afin de limiter le risque d'erreur, ce qui complexifie l'analyse.

Nous proposons cette base de plan de plaque à adapter au nombre d'échantillon :

***Plaque n°1***




***Plaque n°2***



***Protocole***

Le principe du dosage du TNF-α est détaillé dans la partie II, chapitre I.D.2.a.

**1) Fixation des anticorps anti-TNFα dans les puits et pré-traitement des LS**

- Diluer l'anticorps de capture au 100ème dans du tampon carbonate-bicarbonate en ajoutant 110µL d'anticorps de capture à 10,89mL de tampon carbonate-bicarbonate.
- Mettre 100µL d'anticorps de capture dans chaque puits. Couvrir la plaque.

- laisser incuber une nuit à température ambiante -

- Placer 900µL à 1mL de chaque échantillon de LS dans un bain marie à 37°C afin de les décongeler.
- Reprendre la plaque et aspirer l'anticorps de capture. Ajouter 300µL de tampon bloquant dans chaque puits. Couvrir la plaque et laisser incuber 1h à température ambiante.
- Pendant l'heure d'incubation, mélanger dans un tube de 1,5mL pouvant être centrifugé (le premier de la cascade de dilution ultérieure) 800µL de chaque échantillon de LS décongelé avec 80µL de solution de hyaluronidase (utilisation de la hyaluronidase détaillée en partie II, chapitre I.D.2.e et f). Incuber 2h à 37°C.

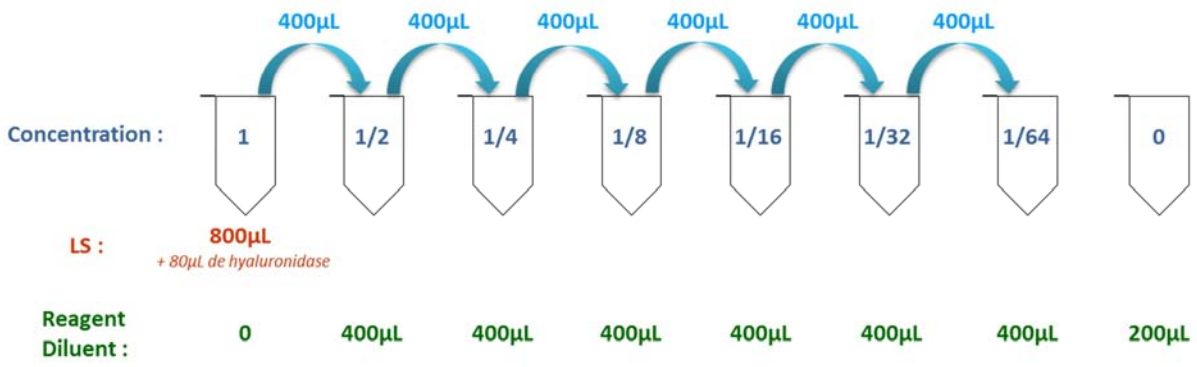
  *Les échantillons peuvent être conservés à -20°C pour un dosage ultérieur.*
- Après l'heure d'incubation, reprendre la plaque et réaspirer le tampon bloquant.

  *(La plaque peut être conservée sèche une nuit à température ambiante ou la plaque est fermée de manière hermétique et stockée à 2-8°C pendant 6 mois).*

**2) Fixation des molécules de TNFα éventuellement présentes dans les échantillons**

- Reconstituer l'étalon dans le Reagent Diluent avec le volume indiqué sur l'étiquette. La concentration de l'étalon reconstitué est de 10000pg/mL.
- Diluer l'étalon reconstitué au 10ème dans du Reagent Diluent afin d'obtenir la concentration maximale de l'étalon (1000 pg/mL). Utiliser le Reagent Diluent pour préparer les dilutions en cascade au ½ de cette concentration maximale. Procéder de la même façon pour les échantillons à doser.

  Nous proposons un schéma de dilution des échantillons de LS :




- Mettre 100µL de chacune des dilutions dans la plaque selon le plan établi précédemment. Couvrir cette dernière et laisser incuber 1h à température ambiante.
- Aspirer et laver trois fois avec le tampon de lavage avec 300µL par puit environ. La solution de lavage peut être placée dans une pissette ou une seringue de 30mL dédiées. Du papier absorbant est placée sur deux épaisseurs de papier bulle. Les puits sont ensuite remplis de solution de lavage grâce à la pissette ou à la seringue. La plaque est ensuite retournée et tapotée fermement sur le papier absorbant. Changer le papier absorbant entre chaque lavage.

**3) Fixation des anticorps de détection**

- Diluer l'anticorps de détection au 100$^{ème}$ dans du Reagent Diluent en mélangeant 110µL d'anticorps de détection et 10,89mL de Reagent Diluent.
- Ajouter 100µL d'anticorps de détection dans chaque puit. Couvrir la plaque et laisser incuber 1h à température ambiante.
- Aspirer et laver trois fois avec du tampon de lavage comme décrit précédemment.

**4) Fixation de la streptavidine HRP et ajout de la solution substrat**

- Diluer la streptavidine-HRP au 400$^{ème}$ dans du Reagent Diluent en mélangeant 30µL de streptavidine-HRP et 12mL de Reagent Diluent.
- Mettre 100µL de streptavidine-HRP ainsi diluée dans chaque puits. Couvrir et laisser incuber 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Pendant ce temps d'incubation, préparer la lecture de l'absorbance qui devra être faite très rapidement après l'ajout de la solution stop.
- Aspirer et laver trois fois avec du tampon de lavage comme décrit précédemment.
- Mettre 100µL de solution de substrat dans chaque puits. Couvrir et laisser incuber 20 minutes à température ambiante.
- Stopper la réaction en ajoutant 100µL de Stop Solution dans chaque puits.

### 5) Mesure de la DO

- Mesurer l'absorbance à 450nm et 550nm dans les 30 minutes suivant l'ajout de la Stop Solution. S'il n'est pas possible de mesurer l'absorbance à 550nm, utiliser les mesures à 450nm seulement.

*Par exemple :*

| 450 nm | Standard | Standard | LSs 1 | LSs 1 | LSs 1 | LSp 1 | LSp 1 | LSp 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *1* | 2,101 | 2,110 | 0,101 | 0,121 | 0,098 | 3,210 | 3,330 | 3,121 |
| *1/2* | 1,253 | 1,262 | 0,001 | 0,010 | 0,000 | 1,615 | 1,685 | 1,550 |
| *1/4* | 0,672 | 0,681 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,802 | 0,851 | 0,820 |
| *1/8* | 0,281 | 0,286 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,412 | 0,432 | 0,401 |
| *1/16* | 0,101 | 0,109 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,206 | 0,222 | 0,210 |
| *1/32* | 0,031 | 0,040 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,098 | 0,105 | 0,101 |
| *1/64* | 0,002 | 0,005 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,010 | 0,022 | 0,051 |
| *0* | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 |

| 550 nm | Standard | Standard | LSs 1 | LSs 1 | LSs 1 | LSp 1 | LSp 1 | LSp 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *1* | 0,195 | 0,199 | 0,005 | 0,011 | 0,009 | 0,432 | 0,398 | 0,250 |
| *1/2* | 0,182 | 0,188 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,221 | 0,197 | 0,185 |
| *1/4* | 0,053 | 0,056 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,122 | 0,101 | 0,099 |
| *1/8* | 0,010 | 0,016 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,050 | 0,051 | 0,048 |
| *1/16* | 0,012 | 0,014 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,011 | 0,022 | 0,012 |
| *1/32* | 0,010 | 0,011 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,003 | 0,000 |
| *1/64* | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| *0* | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

### 6) Calcul des résultats

- Soustraire les valeurs obtenues à 550nm aux valeurs obtenues à 450nm pour corriger les imperfections optiques liées à la microplaque.

*Si nous poursuivons avec notre exemple :*

| 450-550nm | Standard | Standard | LSs 1 | LSs 1 | LSs 1 | LSp 1 | LSp 1 | LSp 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *1* | 1,906 | 1,911 | 0,096 | 0,11 | 0,089 | 2,778 | 2,932 | 2,871 |
| *1/2* | 1,071 | 1,074 | 0,001 | 0,01 | 0 | 1,394 | 1,488 | 1,365 |
| *1/4* | 0,619 | 0,625 | 0 | 0 | 0 | 0,68 | 0,75 | 0,721 |
| *1/8* | 0,271 | 0,27 | 0 | 0 | 0 | 0,362 | 0,381 | 0,353 |
| *1/16* | 0,089 | 0,095 | 0 | 0 | 0 | 0,195 | 0,2 | 0,198 |
| *1/32* | 0,021 | 0,029 | 0 | 0 | 0 | 0,096 | 0,102 | 0,101 |
| *1/64* | 0,002 | 0,005 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0,022 | 0,051 |
| *0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,001 | 0 |

- Calculer la moyenne des résultats obtenus pour chaque échantillon réalisé en triple.

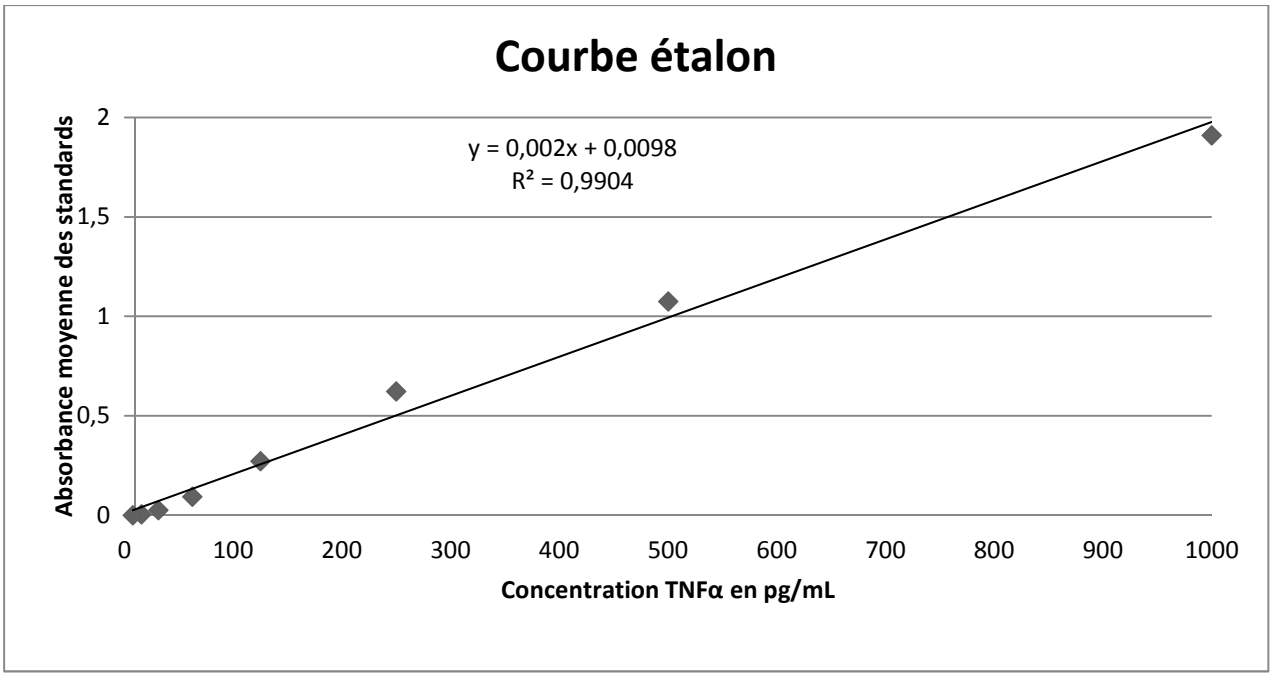
*Par exemple :*

| Moyennes | Standard | LSs 1 | LSp 1 |
|---|---|---|---|
| *1* | 1,909 | 0,098 | 2,860 |
| *1/2* | 1,073 | 0,004 | 1,416 |
| *1/4* | 0,622 | 0,000 | 0,717 |
| *1/8* | 0,271 | 0,000 | 0,365 |
| *1/16* | 0,092 | 0,000 | 0,198 |
| *1/32* | 0,025 | 0,000 | 0,100 |
| *1/64* | 0,004 | 0,000 | 0,028 |
| *0* | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

- Tracer la courbe étalon grâce aux concentrations connues correspondant aux valeurs de DO des standards puis en déduire l'équation de la courbe étalon. L'équation obtenue permet de calculer les concentrations en TNF-α des échantillons en fonction des valeurs d'absorbance.

*Par exemple :*

| Concentration en TNF-α (pg/mL) | Valeurs de DO moyennes des standards |
|---|---|
| 1000 | 1,909 |
| 500 | 1,073 |
| 250 | 0,622 |
| 125 | 0,271 |
| 62,5 | 0,092 |
| 31,25 | 0,025 |
| 15,63 | 0,004 |
| 7,81 | 0,000 |




- Calculer les concentrations en TNF-α des échantillons en utilisant l'équation de la courbe étalon (ou en reportant leurs valeurs de DO sur la courbe étalon).

  **/!** Si l'échantillon est dilué, multiplier la valeur de concentration obtenue par le facteur de dilution.

  *Dans notre exemple :* y = 0,002x + 0,0098 d'où $x = \frac{y-0,0098}{0,002}$

*Ainsi :*

| LIQUIDE SYNOVIAL SAIN N°1 | | | |
|---|---|---|---|
| **Valeurs moyenne de DO** | **Concentration TNFα de l'échantillon (pg/mL)** | **Facteur de dilution** | **Concentration TNFα du LS (pg/mL)** |
| 0,098 | 44,1 | 1 | **44,1** |

| LIQUIDE SYNOVIAL PATHOLOGIQUE N°1 | | | |
|---|---|---|---|
| **Valeurs moyenne de DO** | **Concentration TNFα de l'échantillon (pg/mL)** | **Facteur de dilution** | **Concentration TNFα du LS (pg/mL)** |
| 2,860 | 1425,1 | 1 | 1425,1 |
| 1,416 | 703,1 | 2 | 1406,2 |
| 0,717 | 353,6 | 4 | 1414,4 |
| 0,365 | 177,6 | 8 | 1420,8 |
| 0,198 | 94,1 | 16 | 1505,6 |
| 0,100 | 45,1 | 32 | 1443,2 |
| 0,028 | 9,1 | 64 | 582,4 |
| | | **Moyenne finale de la concentration en TNFα en pg/mL dans le LS** | 1435,9 |

*Remarque : la valeur de concentration correspondant à la dernière valeur de DO est écartée du calcul de la moyenne du fait de sa différence trop importante avec les autres valeurs. En effet, selon la notice d'utilisation du kit, une valeur différant de plus de 10% doit être écartée de l'étude ou prise avec précautions.*

## C. Mesure de l'influence de la qualité du liquide synovial sur l'activité des CSM

Toutes les étapes de cette étude doivent être réalisées de manière très propre, sur un poste de travail adapté à chaque étape, sous PSM dès que possible et dans un laboratoire respectant les BPL.

### 1. Première phase en suspension

#### a. Matériel :

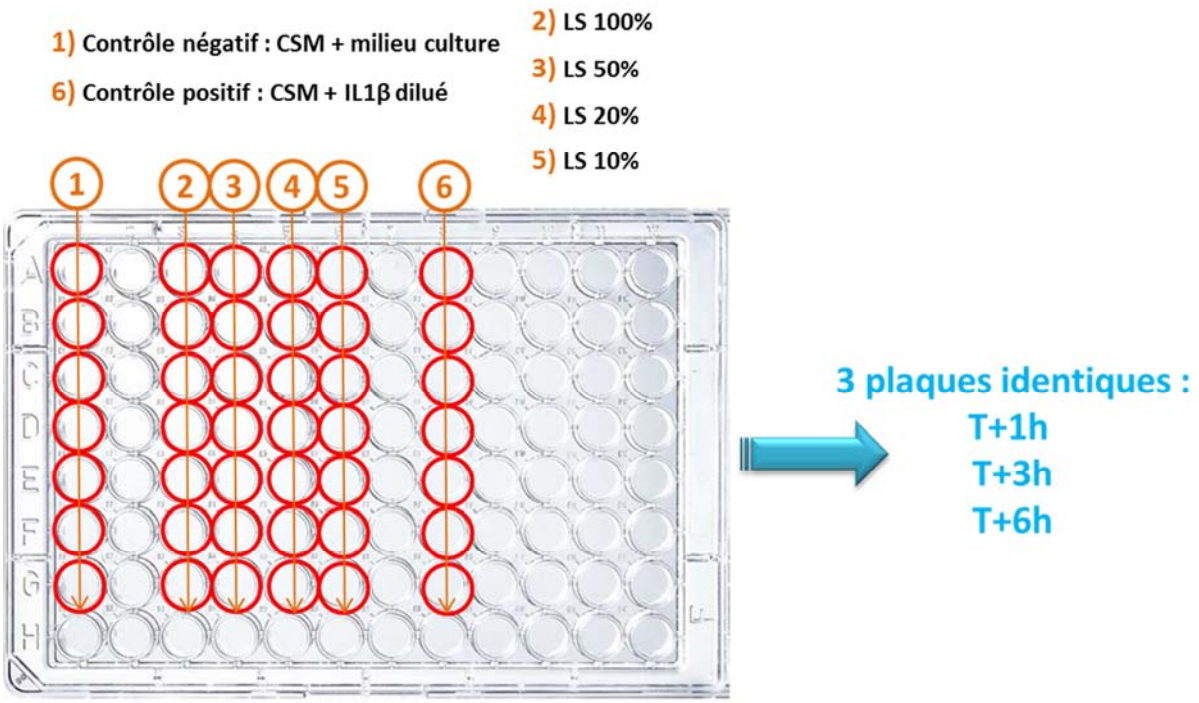
- Les manipulations doivent être réalisées très proprement sous PSM.

- Il est indispensable d'avoir entre 63 et 126 millions de CSM vivantes pour commencer le protocole. Plusieurs jours avant les manipulations, les CSM doivent donc être mises en culture pour atteindre ces chiffres.
- Les échantillons de LS doivent avoir un volume de 4mL.
- Les témoins négatifs sont représentés par des CSM dans leur milieu de culture sans LS.
- Le témoin positif est idéalement une suspension de molécules de TNF-α ou d'IL1-β dilué au 10000$^{ème}$ dans du milieu de culture en présence de CSM.
- Préparer 2µL d'anticorps CMHII-FITC (1mg/mL) et 10µL d'anticorps CMH-I (1mg/mL) par échantillon de LS, y compris pour les témoins. Les conserver à 4°C et à l'abri de la lumière.
- Placer 1µL d'IP à 4°C et à l'abri de la lumière.
- Préparer 200µL de tampon de lyse par échantillon de LS, y compris pour les témoins.
- S'assurer d'avoir de la trypsine à disposition. Compter environ 5mL par flasque de culture cellulaire de 50mL.
- 3 plaques 96 puits à fond plat non traitées pour la culture cellulaire sont utilisées afin que les CSM n'adhèrent pas et restent en suspension.
- 3 plaques traitées pour la culture cellulaire avec un nombre de puits dépendant du nombre d'échantillons (minimum 18 dans notre cas) sont utilisées.
- S'assurer d'avoir à disposition une cellule de Malassez ainsi que du bleu Trypan (environ 50µL).
- Préparer les plan de plaque et identifier correctement les plaques avant de commencer les manipulations

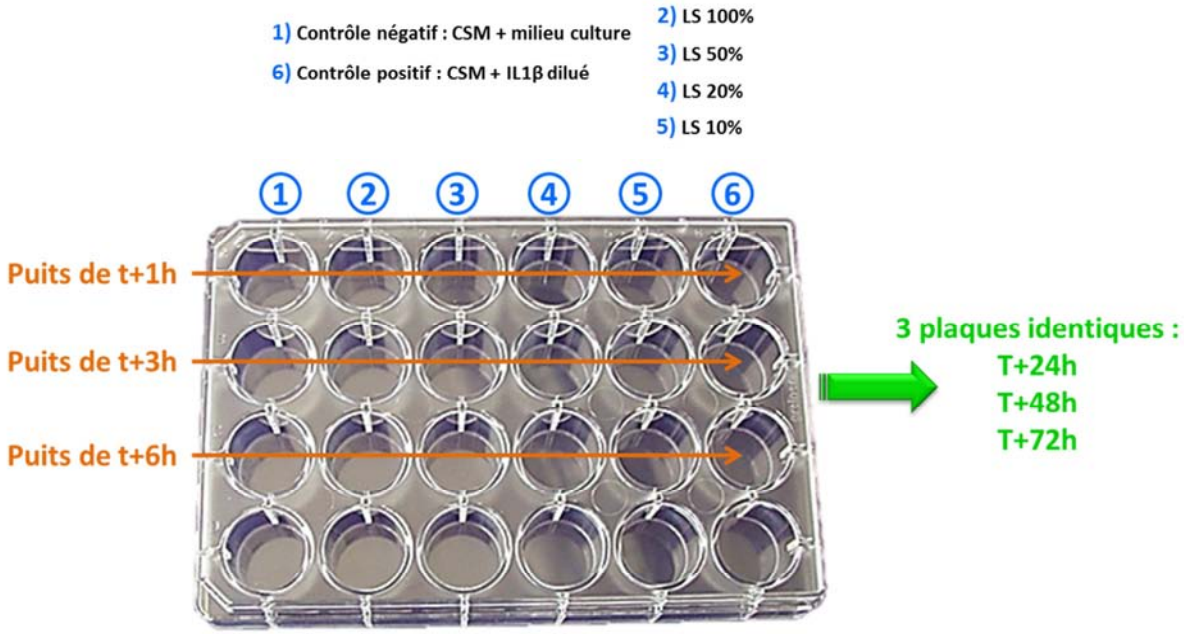
*<u>Plaques 96 puits à fond plat non traitées pour la culture cellulaire</u> : exemple de plan de plaque pour un échantillon de LS :*

*Chaque milieu est réparti sur 7 puits :*

- *le 1$^{er}$ puits servira à réaliser les PCR ultérieures*
- *les 2$^{ème}$, 3$^{ème}$ et 4$^{ème}$ puits serviront à ensemencer les plaques de culture cellulaire en adhérence*
- *le 5$^{ème}$ puits servira à réaliser un marquage CMH-II*
- *le 6$^{ème}$ puits servira à réaliser un marquage CMH-I*
- *le 7$^{ème}$ puits servira à réaliser un marquage IP pour évaluer la mortalité cellulaire*




*Plaques traitées pour la culture cellulaire* : exemple de plan de plaque pour un échantillon de LS :




### b. Méthode

- Si les échantillons de LS étudiés sont congelés à -80°C, les placer dans un bain marie à 37°C.
- Placer également dans un bain marie à 37°C le PBS, le milieu de culture et la trypsine afin d'éviter les chocs thermiques pour les CSM.

- **Dénombrement des CSM :**

✓ s'assurer de l'aspect normal des CSM dans leur milieu de culture en les observant sous microscope. Les CSM doivent être à confluence ou presque à confluence, c'est-à-dire qu'elles recouvrent presque entièrement la zone de culture de la flasque.

✓ réaliser la trypsinisation des CSM en culture afin de les décoller du flacon de culture. Pour un flacon de culture cellulaire classique de 50mL, commencer par réaspirer le milieu de culture. Laver ensuite les CSM avec 20mL de PBS. Ajouter 5mL de trypsine en les répartissant sur l'ensemble de la surface de culture. Placer le flacon 2 min dans un incubateur à 37°C. Ajouter immédiatement 15mL de milieu de culture afin de stopper l'action de la trypsine grâce au BSA contenu dans le milieu de culture. Récupérer le contenu du flacon et le placer dans un tube pouvant contenir environ 20mL de liquide et pouvant être centrifugé. Centrifuger la suspension de CSM 5 min à 0,3 rcf. Eliminer le surnageant et resuspendre les CSM dans 10mL de milieu de culture.

✓ Rassembler la totalité des CSM disponibles dans un contenant de capacité adaptée pouvant être centrifugé. Dans un tube de faible contenance, mélanger 40µL de la suspension de CSM et 40µL de bleu Trypan. Introduire une partie de ce mélange dans une cellule de Malassez et dénombrer les cellules vivantes qui apparaissent incolores (les cellules mortes sont quant à elles colorées en bleu). Dénombrer au moins 3 lignes de la cellule de Malassez et extrapoler le nombre total de CSM en tenant compte des dilutions effectuées. Voir en annexe 6 si nécessaire pour le principe d'utilisation d'une cellule de Malassez. Le nombre total de CSM doit être compris entre 63 et 126 millions de CSM vivantes.

- **Formation des aliquotes de CSM :**

  ✓ centrifuger la suspension de CSM 5 min à 0,3 rcf.

  ✓ éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 600µL de milieu de culture.

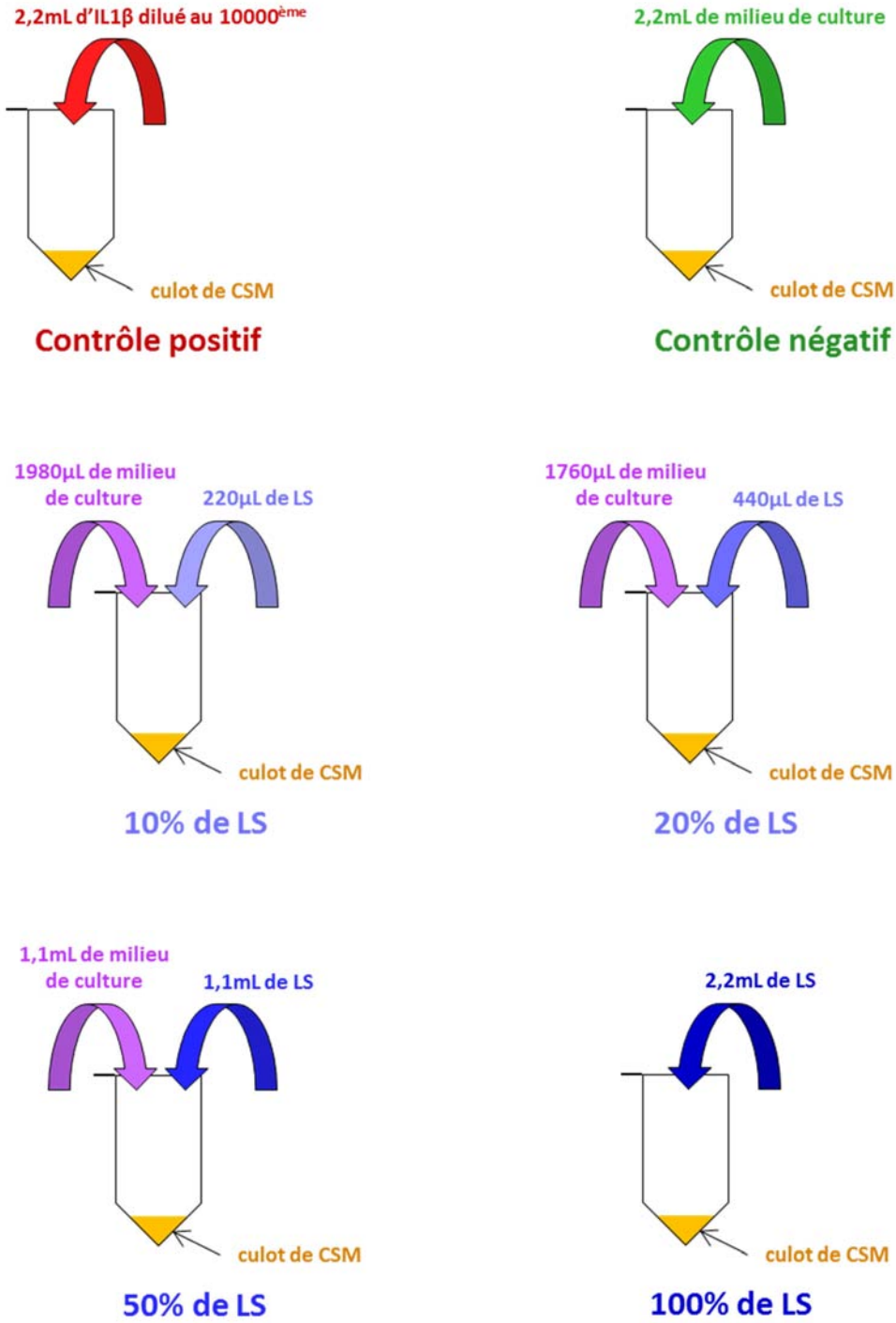
  ✓ répartir 100µL de la suspension dans 6 tubes de 2,5mL pouvant être centrifugés.

  ✓ centrifuger les tubes 5 min à 0,2 rcf.

  ✓ éliminer le surnageant.

- Préparer la solution d'IL1-β dilué au 10000$^{ème}$ dans du milieu de culture. Préparer 2,2mL de solution par échantillon testé.

- **Préparation des milieux :**




- Remettre en suspension les culots de CSM dans les différents milieux réalisés et déposer 100µL dans chaque puits selon le plan de plaque établi précédemment (partie 1.a).
- Les 3 microplaques sont mises à incuber à 37°C avec 5% de $CO_2$.

- **A chaque temps (t+1h, +3h et +6h), réaliser <u>dans l'ordre</u> les manipulations suivantes :**

**1) Congélation des CSM pour PCR**

***/!*** *Pour cette étape il est nécessaire d'avoir une enceinte à -80°C proche du poste de travail ou une seconde personne à disposition pouvant rapidement déposer les tubes à -80°C pendant que le manipulateur poursuit son protocole.*

- ✓ Transférer le contenu des puits de la ligne A (1ère ligne) dans des tubes de 1,5mL correctement identifiés et pouvant être centrifugés.
- ✓ Centrifuger 5 min à 0,3 rcf
- ✓ Eliminer les surnageants
- ✓ Remettre en suspension les culots cellulaires dans 200µL de tampon de lyse.
- ✓ Placer les tubes à -80°C dans les 5 minutes.

**2) Ensemencement des plaques en adhérence**

- ✓ Transférer le contenu des puits de la ligne B (2ème ligne) dans la 1ère plaque (T+24h), les puits de la ligne C (3ème ligne) dans la seconde plaque (T+48h) et enfin les puits de la ligne D (4ème ligne) dans la dernière plaque (T+72h). Se référer au plan de plaque établi précédemment (partie 1.a).
- ✓ Placer les plaques à incuber à 37°C avec 5% de $CO_2$.

**3) Marquage CMH-II**

- ✓ En limitant au maximum l'exposition des anticorps à la lumière, préparer la suspension d'anticorps en mélangeant 14µL de CMHII-FITC (1mg/mL) à 196µL de PBS (quantités pour 6 à 7 puits). Entourer le tube contenant la suspension avec du papier aluminium et le placer à 4°C.
- ✓ Transférer le contenu des puits de la ligne E (5ème ligne) dans des tubes de 1,5mL correctement identifiés et pouvant être centrifugés.
- ✓ Ajouter 150µL de PBS dans chaque tube.
- ✓ Centrifuger 2,5 minutes à 150G.
- ✓ Eliminer les surnageants.
- ✓ Remettre en suspension les culots cellulaires dans 150µL de PBS.
- ✓ Centrifuger 2,5 min à 150G.
- ✓ Eliminer les surnageants.
- ✓ Ajouter 30µL de solution anticorps CMH-II à chaque culot cellulaire et mélanger.
- ✓ Laisser incuber 20 min à 4°C à l'abri de la lumière. Ce temps d'attente peut être mis à profit pour commencer le marquage CMH-I.

- ✓ Centrifuger 2,5 minutes à 150G.
- ✓ Eliminer les surnageants (enlève les anticorps non attachés).
- ✓ Reprendre les culots cellulaires dans 150µL de PBS.
- ✓ Centrifuger 2,5 min à 150G.
- ✓ Eliminer les surnageants
- ✓ Reprendre les culots cellulaires dans 150µL de PBS
- ✓ Placer les tubes à 4°C en les protégeant de la lumière avant le passage sur FACS (qui sera réalisé après le passage sur FACS des CSM marquées à l'IP).

**4) Marquage CMH-I**

- ✓ En limitant au maximum l'exposition des anticorps à la lumière, préparer la suspension d'anticorps en mélangeant 70µL de CMHI-FITC (1mg/mL) à 140µL de PBS (quantités pour 6 à 7 puits). Entourer le tube contenant la suspension avec du papier aluminium et le placer à 4°C.
- ✓ Transférer le contenu des puits de la ligne F (6$^{ème}$ ligne) dans des tubes de 1,5mL correctement identifiés et pouvant être centrifugés.
- ✓ Ajouter 150µL de PBS dans chaque tube.
- ✓ Centrifuger 2,5 minutes à 150G.
- ✓ Eliminer les surnageants.
- ✓ Remettre en suspension les culots cellulaires dans 150µL de PBS.
- ✓ Centrifuger 2,5 min à 150G.
- ✓ Eliminer les surnageants.
- ✓ Ajouter 30µL de solution anticorps CMH-I à chaque culot cellulaire et mélanger.
- ✓ Laisser incuber 20 min à 4°C à l'abri de la lumière. Ce temps d'attente peut être utilisé pour passer les tubes de CSM marquées CMH-I sur FACS.
- ✓ Centrifuger 2,5 minutes à 150G.
- ✓ Eliminer les surnageants (enlève les anticorps non attachés).
- ✓ Reprendre les culots cellulaires dans 150µL de PBS.
- ✓ Centrifuger 2,5 min à 150G.
- ✓ Eliminer les surnageants
- ✓ Reprendre les culots cellulaires dans 150µL de PBS
- ✓ Placer les tubes à 4°C en les protégeant de la lumière avant le passage sur FACS (qui sera réalisé après le passage sur FACS des CSM marquées à l'IP).

### 5) Marquage IP

*Attention, cette manipulation est rapide et les CSM devront être passées sur FACS dans les 5 minutes suivant l'ajout de la solution IP diluée. Il faut donc s'assurer que tout est prêt pour avant de commencer cette étape.*

- ✓ Diluer l'IP au 10000ème (1µL d'IP dans 10 mL de PBS : quantités suffisantes pour l'ensemble des manipulations). Entourer le tube de papier d'aluminium.
- ✓ Transférer les cellules en suspension de la ligne G (7ème ligne) dans des tubes de 1,5mL correctement identifiés et pouvant être centrifugés.
- ✓ Ajouter 150µL de PBS dans chaque tube
- ✓ Centrifuger 2,5 minutes à 150G
- ✓ Eliminer les surnageants
- ✓ Reprendre les culots cellulaires dans 100µL de solution d'IP dilué au 10000ème
- ✓ Passer les CSM sur FACS dans les 5min. Les tubes en attente doivent être placés à l'abri de la lumière.

## 2. 2ème phase en adhérence

Pour les 3 plaques traitées pour la culture cellulaire (T+24h +48h +72h), réaliser les étapes suivantes :

- ✓ Observer sous microscope les CSM dans leur milieu de culture afin d'estimer leur aspect, une éventuelle mortalité anormale…
- ✓ Réaliser la trypsinisation des CSM pour les décoller du fond de la plaque en commençant par réaspirer le milieu de culture. Laver ensuite les CSM avec 1mL de PBS. Répartir de la trypsine sur l'ensemble de la surface de culture de chaque puits (dans notre exemple, nous utiliserons 500µL par puits). Placer la plaque 2 min dans un incubateur à 37°C. Ajouter immédiatement 1mL de milieu de culture dans chaque puit.
- ✓ Transférer le contenu des puits dans des tubes de 2,5mL pouvant être centrifugés et correctement identifiés. Centrifuger les tubes 5 min à 0,3 rcf. Eliminer le surnageant et resuspendre les CSM dans 900µL de milieu de culture.
- ✓ Réaliser le comptage des CSM en mélangeant 40µL de la suspension de CSM et 40µL de bleu Trypan. Introduire une partie de ce mélange dans une cellule de Malassez et dénombrer les cellules vivantes qui apparaissent incolores (les cellules mortes sont quant à elles colorées en bleu). Dénombrer au moins 3 lignes de la cellule de Malassez et extrapoler le nombre total de CSM en tenant compte des dilutions effectuées. Si nécessaire, consulter l'annexe 6 pour l'utilisation de la cellule de Malassez.

- ✓ La suite dépend du nombre de CSM dénombrées :
  - privilégier la congélation des CSM pour PCR (au moins 10000 CSM),
  - ensuite, si cela est possible, réaliser un marquage IP > un marquage CMH-II > un marquage CMH-I en suivant le protocole de la partie en suspension.

### 3. Réalisation de la PCR quantitative

Le principe de la PCR quantitative est détaillé en partie II, chapitre I.C.1.a.

#### a. Choix des molécules cibles

Choisir un ou plusieurs gènes susceptibles d'être exprimés par les CSM. Choisir obligatoirement au minimum un gène de ménage (cf partie II, chapitre I.C.1.b).

#### b. Elaboration des amorces

Il est judicieux de s'appuyer dans la mesure du possible, sur des publications pertinentes utilisant les amorces des gènes choisis. Cela permet d'avoir des séquences et des protocoles de PCR qui ont déjà fait leurs preuves.

Si aucune publication ne semble pertinente, les amorces peuvent être élaborées grâces au site NCBI (« NCBI » -> « BLAST » -> « Primer-BLAST »). Une vérification des amorces prises dans un article grâce au site NCBI est également requise.

#### c. Extraction d'ARN

Utilisation du kit Perfect Pure RNA Cell & Tissue.

Travailler en poste spécial, avec du matériel adapté à la biologie moléculaire et dans le respect des bonnes pratiques afin d'éviter toute contamination des échantillons par de l'ARN étranger

Pour chaque tube précédemment congelé à -80°C :

- Placer le tube de lysat dans un bain marie à 37°C.
- **Adsorption de l'ARN sur la membrane de silice (ou colonne) :**
  - ✓ Pipeter 400µL de lysat dans la colonne de purification

- ✓ Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute. Le lysat doit être complètement passé à travers la colonne, sans laisser de matériel résiduel.
- ✓ Transférer la colonne de purification dans un nouveau tube.
- ✓ Ajouter 400µL de solution de lavage 1 dans la colonne de purification. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute.
- ✓ Transférer la colonne de purification dans un nouveau tube.

- **Traitement à la DNase afin d'éliminer les éventuelles molécules d'ADN adsorbées sur la membrane de silice :**
  - ✓ Appliquer 50µL de solution DNase dans la colonne de purification. Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
  - ✓ Ajouter 200µL de solution de lavage DNase dans la colonne.
  - ✓ Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute.
  - ✓ Ajouter 200µL de solution de lavage DNase à la colonne de purification.
  - ✓ Centrifuger à 13000-16000 g pendant 2 minutes.
  - ✓ Transférer la colonne de purification dans un nouveau tube.

- **Elimination des derniers éléments résiduels hors ARN :**
  - ✓ Ajouter 200µL de solution de lavage 2 dans la colonne de purification.
  - ✓ Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute.
  - ✓ Ajouter 200µL de solution de lavage 2 dans la colonne de purification.
  - ✓ Centrifuger à 13000-16000 g pendant 2 minutes.

- **Elution de l'ARN grâce à un tampon à pH spécifique et récupération :**
  - ✓ Transférer avec précaution la colonne de purification dans un nouveau tube. Ne pas mettre en contact la colonne de purification avec les déchets du tube.
  - ✓ Ajouter 50-100µL de solution d'élution dans la colonne de purification afin d'éluer l'ARN.
  - ✓ Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute.
  - ✓ Jeter la colonne de purification.

Placer le tube contenant l'ARN purifié dans la glace. Si l'ARN n'est pas utilisé immédiatement, le stocker à -80°C.

### d. Dosage d'ARN par spectrophotométrie

- ✓ Afin de réaliser le blanc ou le zéro, réaliser une mesure d'absorbance à 260nm d'une cuvette remplie de 50µL d'eau distillée
- ✓ Placer 5µL de l'échantillon d'ARN dans une cuvette à spectrophotométrie
- ✓ Ajouter 50µL d'eau distillée (dilution au $10^{ème}$)
- ✓ Réaliser une mesure d'absorbance à 260nm. Les échantillons dilués peuvent être testés plusieurs fois afin de reproduire les mesures d'absorbance et d'affiner les résultats obtenus.
- ✓ Extrapoler la concentration en ARN de l'échantillon grâce à la loi de Beer-Lambert :

$$A = DO = \varepsilon l c$$

où ε est égal au coefficient d'extinction molaire, c indique la concentration et l représente la longueur de parcours de la cuvette.

- ✓ La quantité totale d'ARN dans l'échantillon est obtenue en tenant compte de la dilution au $1/10^{ème}$.

*Exemple de tableau récapitulatif :*

| | Echantillons | DO moyenne mesurée à 260 nm | Concentration en ARN dans la cuvette (ng/µL) | Quantité totale d'ARN dans l'échantillon (µg) |
|---|---|---|---|---|
| **1** | | | | |
| **2** | | | | |
| **3** | | | | |
| **4** | | | | |

### e. Synthèse des ADNc

- ✓ Utiliser un kit Takara Bio© contenant l'eau et les enzymes nécessaires à la synthèse d'ADNc.
- ✓ Travailler en poste adapté, avec du matériel adapté à la biologie moléculaire et dans le respect des bonnes pratiques afin d'éviter toute contamination des échantillons par de l'ARN étranger
- ✓ Calculer le volume d'échantillon correspondant à 500ng d'ARN. Placer ce volume dans un tube adapté au thermocycler.
- ✓ Ajouter 2µL d'enzymes.
- ✓ Compléter avec de l'eau pour atteindre un volume total de 10µL.
- ✓ Placer le tube dans un thermocycler et programmer le cycle suivant : 30°C 10min, 42°C 30min, 95°C 5min, 4°C.

✓ Une fois le cycle achevé, les tubes sont conservés à 4°C.

*Exemple de tableau récapitulatif de la synthèse d'ADNc :*

| | Echantillons | Volume d'échantillon correspondant à 500ng d'ARN (µL) | H2O (µL) | Enzymes (µL) | Volume final (µL) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Contrôle positif | 2,1 | 5,9 | 2 | 10 |

### f. Test des amorces

But : trouver le cycle permettant l'amplification de tous les gènes d'intérêt choisis ainsi que le ou les gène(s) de ménage.

- Travailler en poste spécial avec du matériel adapté à la biologie moléculaire et dans le respect des bonnes pratiques afin d'éviter toute contamination des échantillons par de l'ADN étranger
- Utiliser un kit de PCR quantitative contenant l'eau moléculaire et le mix à qPCR (tampon de réaction, ADN polymérase thermostable, amorces d'oligonucléotides, désoxynucléotides (dNTP) et ions magnésium).

1. Choisir 3 échantillons d'ADNc, les placer dans un bain marie à 37°C.

*Par exemple :*

- *T+1h contrôle –*
- *T+1h contrôle +*
- *T+1h LSs 20%*

2. Réaliser le mélange décrit ci-dessous dans un tube adapté à la biologie moléculaire. Réaliser autant de mélanges que le nombre d'amorces testées.
   - 25µL de mix
   - 11,5µL d'eau
   - 0,5µL d'amorce sens
   - 0,5µL d'amorce anti-sens
3. Transférer 15µL de chaque mélange dans deux microtubes.
4. Mélanger 20µL de chaque échantillon d'ADNc choisis dans un tube adapté.
5. Ajouter 5µL du pool d'ADNc ainsi constitué à chaque microtube contenant 15µL de l'étape 3.
6. Placer les microtubes dans un thermocycler et programmer 40 cycles :

- préactivation réalisée une unique fois en début de premier cycle : 95°C 1 min
- 95°C 3 secondes
- 62°C 20 secondes } 40 fois
- 72°C 3 secondes
- un cycle de dissociation en fin de dernier cycle

- Ces cycles peuvent être modifiés selon les cycles décrits dans les éventuelles publications dans lesquelles les séquences des amorces ont été prises.
- Vérifier que chaque gène d'intérêt est exprimé dans les conditions choisies. Si ce n'est pas le cas, faire un nouveau test des amorces en modifiant les cycles et/ou envisager de modifier les séquences d'une ou de plusieurs amorces.

#### g. PCR quantitative

- Travailler en poste spécial avec du matériel adapté à la biologie moléculaire et dans le respect des bonnes pratiques afin d'éviter toute contamination des échantillons par de l'ADN étranger
- Utiliser un kit de PCR quantitative contenant l'eau moléculaire et le mix à qPCR.

1. Placer l'échantillon d'ADNc à tester dans un bain marie à 37°C.
2. Réaliser le mélange décrit ci-dessous dans un tube adapté à la biologie moléculaire. Réaliser autant de mélanges que le nombre d'amorces.
   - 25µL de mix
   - 11,5µL d'eau
   - 0,5µL d'amorce sens
   - 0,5µL d'amorce anti-sens
3. Transférer 15µL de chaque mélange dans deux microtubes.
4. Ajouter 5µL d'échantillon d'ADNc dans les deux microtubes.
5. Placer les microtubes dans un thermocycler et programmer les cycles permettant d'amplifier tous les gènes d'intérêt selon les tests des amorces effectués précédemment.

### D. Conclusion

Conclure en interprétant les résultats en fonction des différentes informations identifiées :

- caractéristiques macroscopiques et densité protéique du LS

- composition cellulaire du LS
- concentration en TNF-α du LS
- mortalité cellulaire, expression du CMHI et CMHII des CSM
- profil sécrétoire des CSM

# CONCLUSION

L'ostéoarthrose est une maladie complexe atteignant l'ensemble des tissus de l'articulation synoviale et admettant une composante inflammatoire non négligeable. Cette maladie invalidante a des répercussions socio-économiques lourdes tant en médecine humaine que vétérinaire. Pourtant, les traitements proposés aujourd'hui sont insuffisants et ne permettent qu'une gestion approximative de la douleur générée par la maladie lorsqu'un stade lésionnel irréversible est déjà atteint.

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) s'inscrivent dans des recherches actives menées aujourd'hui pour combattre efficacement l'ostéoarthrose avec l'espoir de réussir à guérir un jour cette maladie. L'intention première de l'utilisation des CSM dans cette affection reposait sur leur grande capacité de différenciation avec pour objectif de réaliser de véritable greffe de cartilage sain. Les travaux plus récents ont montré que les CSM ont également la possibilité d'agir directement au sein de l'organe diarthrosique *via* leurs sécrétions anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Elles permettraient ainsi une rupture précoce du cercle vicieux de l'inflammation ostéoarthrosique, limitant de fait les lésions articulaires et favorisant la réparation des lésions tissulaires.

Notre travail a permis la mise au point d'un protocole d'expérimentation *in vitro* permettant de caractériser le liquide synovial issu d'articulations ostéoarthrosiques et de mesurer son influence sur les CSM. Mieux maitriser l'influence de l'environnement articulaire sur les CSM permettra de mieux appréhender le mécanisme d'action des CSM dans le traitement de l'ostéoarthrose et d'améliorer les biothérapies intra-articulaires afin de guérir cette affection douloureuse et invalidante.

**Thèse de Mme Elodie Dubois**

**Le Professeur responsable Caroline Boulocher**
**VetAgro Sup campus vétérinaire**

**Le Directeur général**
**VetAgro Sup**

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE
VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

**Le Président de la thèse Professeur Chapurlat**

**Vu et permis d'imprimer**

**Lyon, le** - 9 JUIL. 2015

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

**Le Président de l'Université, Professeur F.N GILLY**

## Bibliographie


Abedowale, A. C. (2000, Spring). Analysis of glucosamine and chondroitin sulphate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulphate raw materials. *American Nutraceutical Association, 3*(1), pp. 37-44.

Anderson, D. C. (2011, June). Post-traumatic osteoarthritis : improved understanding and opportunities for early intervention. *Journal of orthopaedic research, 6*(29), pp. 802-809.

Anglin, T. C. (2010, January 14). Free energy and entropy of activation for phospholipid flip-flop in planar supported lipid bilayers. *The Journal of Physical Chemistry, 114*(5), pp. 1903-1914.

Archer, C. a.-W. (2003). The chondrocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 35*, pp. 401-404.

Asahara, T. K. (2000, March). Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Therapy, 7*(6), pp. 451-457.

Asensio, G. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in food science & technology, 18*(11), pp. 558-566.

Auer, J. S. (2012). *Equine Surgery* (éd. 4th). Saint Louis: Elsevier Saunders.

Balakrishnan, L. N. (2014, February 17). Porteomic analysis of human osteoarthritis synovial fluid. *Clinical Proteomics, 11*(1).

Baltzer A.W., M. C. (2009, February). Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage, 17*(2), pp. 152-160.

Baltzer, A. O. (2013, June 7). A new treatment for hip osteoarthritis : clinical evidence for the efficacy of autologous conditionel serum. *Orthopedic reviews, 2*(5).

Barone, R. (2000). *Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques tome 2 : Arthrologie et myologie* (éd. 4e). Paris: Vigot.

Bates, J. J. (2014, April). Emerging genetic basis of osteochondritis dissecans. *Clinics in sports medicine, 33*(2), pp. 199-220.

Bellocq, L. (2007). Arthrose du chien (et du chat) : aspect médical et suivi. *La Dépêche vétérinaire Supplément Technique*(107), p. 27.

Bennett, D. E. (2013, March 1). The effect of robenacoxib on the concentration of C-reactive protein in synovial fluid from dogs with osteoarthritis. *BioMed Central Veterinary Research*, p. 9.

Berenbaum, F. (2013, January). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis !). *Osteoarthritis and Cartilage, 21*(1), pp. 16-21.

Bertone, A. I. (2014, February). Evaluation of a single intra-articular injection of autologous protein solution for treatment of osteoarthritis in horses. *American Journal of Veterinary Research, 75*(2), pp. 141-151.

Bismuth, C. (2008). *Les cellules souches chez l'adulte : applications possibles en médecine vétérinaire.* Ecole vétérinaire d'Alfort.

Blewis, M. N.-D. (2007). A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *European Cells and Materials, 13*, pp. 26-39.

Boire, C. (2012, Octobre). Le point sur la physiopathologie de l'arthrose chez le chien. *Le point vétérinaire, 43*(329), pp. 62-68.

Bourzac, C. (2009). *Thérapie par les cellules souches mésenchymateuses dans la guérison tendineuse chez le cheval.* Montréal: Université de Montréal.

Boutrand, J. (1994). *Etiopathogenie de l'arthrose : étude bibliographique.* Lyon, France: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

Bresnihan, B. A.-G. (1998, December). Treatment ef rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis and rheumatism, 41*(12), pp. 2196-2204.

Cambournac, M. (2012). *Apports de la cytométrie en flux dans la reproduction des carnivores domestiques.* Lyon, Rhône, France: Thèse de Doctorat Vétérinaire.

Caplan, A. (2007, November). Adult mesenchymal stem cells for tissus engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology, 213*(2), pp. 341-347.

Caron, J. (2005). Intra-articular injections for joint disease in horses. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice, 3*(21), pp. 559-573.

Caron, J. (2006, August/September). Therapy for equine joint disease. Large animal veterinary rounds. *6*(7).

Caron, J. G. (2008). Principle and practices of joint disease treatment. Dans M. D. Ross, *Diagnosis and management of lameness in the horse* (pp. 746-757). Saunders.

Carrade, D. A. (2011 a, November ). Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy, 10*(13), pp. 1180-1192.

Carrade, D. O. (2011 b, April). Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy, 4*(13), pp. 419-430.

Carter, R. E.-H. (2011, September). Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. *Equine Veterinary Journal, 5*(43), pp. 543-551.

Catteral, J. S. (2010, december 31). Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury . *Arthritis research & therapy, 12*(6).

Cerza, F. C. (2012, December). Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis. *The American journal of sports medicine, 12*(40), pp. 2822-2827.

Cevik, I. D. (2003). Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury. *Cell Death and Differentiation*(10), pp. 928-929.

Chan, J. T. (2006, June 15). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood, 107*(12), pp. 4817-4824.

Chan, K. S. (2014, July 2). Clinical, radiological and ultrasonographic findings related to knee pain in osteoarthritis. (W. Zhan, Éd.) *Plos one, 7*(9).

Chang, D. A.-L. (2008, January 9). Conformational mechanics, adsorption, and normal force interactions of lubricin and hyaluronic acid on model surfaces. *Langmuir, 24*(4), pp. 1183-1193.

Chen, T. L. (2014, July). The efficacy of chock wave therapy in patients with knee osteoarthritis and popliteal cyamella. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 30*(7), pp. 362-370.

Chiaradia, E. P. (2012, July 19). Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. *Journal of proteomics, 14*(75), pp. 4478-4493.

Christensen, R. B. (2007). The effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*(66), pp. 433-439.

Clegg, P. (2006). Therapy for osteoarthritis in the horse - How do we know that it works ? *The Veterinary Journal*(171), pp. 9-10.

Cluzel, C. B. (2013). Foetal and Postnatal Equine Articular Cartilage Development : Magnetic Resonance Imaging and Polarised Light Microscopy. *European Cells and Materials, 26*, pp. 33-48.

Coleman, C. C. (2010, October). Mesenchymal stem cells and osteoarthritis : remedy or accomplice ? *Human gene therapy, 21*(10), pp. 1239-1250.

Daniel, A. J. (2012, May 1). Comparison of radiography, nuclear scintigraphy, and magnetic resonance imaging for detection of specific conditions of the distal tarsal bones of horses : 20 cases (2006-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association, 240*(9), pp. 1109-1114.

Demay, A. C. (2004). *Contribution à l'étude d'un modèle expérimental de l'inflammation articulaire chez le cheval : recherche d'un marqueur précoce de l'inflammation.* Alfort, France: Thèse pour le Doctorat Vétérinaire.

Demoor, M. O.-L.-G. (2014, August). Cartilage tissue engineering : molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta, 1840*(8), pp. 2414-2440.

Desrochers, J. A. (2013, Septembre). Microscale surface friction of articular cartilage in early osteoarthritis. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 25*, pp. 11-22.

Dieppe, P. (1998). *Osteoarthrisis and related disorders : pathology, in Rheumatology.* Saint Louis: Mosby Year Book.

Duesterdieck-Zellmer, K. D. (2012, October). Concentration-dependent effects of tiludronate on equine articular cartilage explants incubated with and without interleukin-1B. *American journal of veterinary research, 10*(73), pp. 1530-1539.

Edwards, S. (2011, October). Intra-articular drug delivery : the challenge to extend drug residence time within the joint. *The Veterinary Journal, 190*(1), pp. 15-21.

Ekman, L. G. (1981). Volume of the synovia in certain joint cavities in the horse. *Acta veterinaria Scandinavia, 22*(1), pp. 23-31.

Eshghi, S. S. (2008). Engineering microenvironments to control stem cell fate and function. *Stem Book*, p. 12.

Fahy, N. F. (2014, June 20). Immune modulation to improve tissue engineering outcomes for cartilage repair in the osteoarthritic joint. *Tissue engineering. PartB, Reviews*.

Fam, H. B. (2007). Rheological properties of synovial fluids. (I. Press, Éd.) *Biorheology, 44*(2), pp. 59-74.

Fam, H. K. (2009, February 27). Effect of concentration and molecular weight on the rheology of hyaluronic acid. (I. Press, Éd.) *Biorheology, 46*(1), pp. 31-43.

Fayolle, P. (1997). Arthrose. *EMC vétérinaire - Orthopédie, 4*(0200), pp. 1-15.

Fayolle, P. (2007). Qu'est ce que l'arthrose chez le chien et le chat, pourquoi ? Comment ? *Le nouveau praticien vétérinaire*(35), pp. 8-16.

Fédération Equestre Internationale, F. (2013, August). *FEI list of detection times*. Récupéré sur http://www.fei.org/fei/cleansport/ad-h/detection-times.

Felson, D. Z. (1992). Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. *The Framingham Study, Annales de médecine interne, 116*, pp. 535-539.

Filardo, G. K. (2012). Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disorders, 229*(13), p. 8.

Fox, S. B. (2009, November). The basic science of articular cartilage. *Sports Health*(6), pp. 461-468.

Frandson, R. L. (2003). *Anatomy and physiologie of farm animals* (éd. 6). Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Frisbie D.D., K. C. (2007, March). Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *American journal of veterinary research, 68*(3), pp. 290-296.

Frisbie, D. (2006). Synovial Joint Biology and Pathobiology. Dans *Equine Surgery* (éd. 3e, pp. 1036-1055). Saint Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

Frisbie, D. (2012). Synovial Joint Biology and Pathobiology. Dans *Equine Surgery* (pp. 1096-1114). Saint Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders.

Frisbie, D. S. (2011). Cell-based therapies for equine joint disease. (Elsevier, Éd.) *Veterinary Clinic Equine*(27), pp. 335-349.

Garnier, M. D. (2004). *Dictionnaire illustré des termes de médecine* (éd. 28e). Paris: Maloine.

Gaschen, L. B. (2012, December). Musculoskeletal injury in thoroughbred racehorses : correlation of findings using multiple imaging modalities. *Veterinary Clinics of North America : Equine Practice, 28*(3), pp. 539-561.

Gelber, A. H. (2000, September 5). Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Annals of internal medicine, 5*(133), pp. 321-328.

Genevois, J. (2005, Janvier/février). Arthrose : actualités thérapeutiques. *Bulletin de la société vétérinaire pratique de France, 89*(1), pp. 23-32.

Ginis, I. G. (2012, June). Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue engineering. Part C, Methods., 18*(6), pp. 453-463.

Giraldo, C. L. (2013). Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Veterinary Research, 29*(9), p. 10.

Good, N. W. (1966, February). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry, 5*(2), pp. 467-477.

Goodrich, L. N. (2006, January). Medical treatment of osteoarthritis in the horse - A review. *The Veterinary Journal, 171*(1), pp. 51-69.

Gross, J. F. (2009). *Musculoskeletal Examination* (éd. 3rd). Wiley-Blackwell.

Helmick, C. F. (2008, January). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis and rheumatism, 1*(58), pp. 15-25.

Herzog, E. C. (2003, November 15). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood, 102*(10).

Hsieh, J. S. (2013, October 8). CD8+ T Cell-Induced expression of tissue inhibitor ef metalloproteinses-1 exacerbated osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences, 14*(10), pp. 19951-19970.

Hunter, D. S. (2014, March 25). The individual and socioeconomis impact of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*.

Hurlbeck, C. E. (2014, June). Evaluation of biomarkers for osteoarthritis caused by fragmented medial coronoid process in dogs. *Research in Veterinary Science, 96*(3), pp. 429-435.

Igbal, K. K. (2012, July-August). Effects of immobilization on thickness of superficial zone of articular cartilage of patella in rats. *Indian Journal of Orthopaedics, 46*, pp. 391-394.

Imbert, A. (2005). *Les immunoglobulines colostrales bovines : étude comparée de trois méthodes de dosages à partir de données expérimentales et influence de différents facteurs sur la concentration.* Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Jain, M. N. (2006, June 30). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications, 345*(2), pp. 646-651.

Jiang, L. T. (2012). Body mass index and suceptibility to knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*(79), pp. 291-297.

Johnson, V. H. (2014, February). The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 28*(1), pp. 5-15.

Kamolz, L. K. (2014, May 2). Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote wound healing ant tissue regeneration. *Stem cell research and therapy, 5*(3).

Kang, J. P. (2012, August 8). Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *Journal of Veterinary Science, 3*(14), pp. 367-371.

Karsdal, M. C.-J. (2014, January). Osteoarthritis - a case for personalized health care ? *Osteoarthritis and Cartilage, 22*(1), pp. 7-16.

Kon, E. F. (2013). PRP for the treatment of cartilage pathology. *The Open Orthopaedics Journal, 7*, pp. 120-128.

Koskinen, A. V. (2014). Resistin as a factor in osteoarthritis : synovial fluid resistin concentrations correlate positively with interleukin 6 and matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-3. *Scandinavian journal of rheumatology, 43*(3), pp. 249-253.

Krampera, M. F. (2007, July). Mesenchymal stem cells : from biology to clinical use. *Blood transfusion, 5*(3), pp. 120-129.

Landinez-Parra, N. G.-A.-A. (2012). Mechanical behavior of articular cartilage. *Injury and Skeletal Biomechanics, 11*, pp. 197-216.

Lange-Consiglio, A. C. (2012, December 30). Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow : In vitro proliferative and multilineage potential assessment. *Equine Veterinary Journal*(45), pp. 737-744.

Larbret, F. (2011). *Etude de la mort cellulaire par cytométrie en flux.* INSERM & Université Nice Sophia Antipolis, Hôpital L'Archet, Nice.

Launois, T. (2007, Avril/Mai/Juin). Comment gérer les chevaux arthrosiques ? *Le Nouveau Praticien Vétérinaire Equine, 351*, pp. 19-24.

Le Blanc, K. T. (2003, October). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology, 31*(10), pp. 890-896.

Leijs, M. V. (2012, August 2). Effect of arthritic synovial fluids on the expression of immunomodulatory factors by mesenchymal stem cells : an explorative in vitro study. *Frontiers in immunology, 3*(231), p. 7.

Lejeune, J. S. (2006). L'ostéo-arthropathie dégénérative du cheval : pathogénie et moyens diagnostiques. *Annales de médecine vétérinaire*(150), pp. 173-192.

Ley, C. E. (2013, June). Evaluation of osteochondral sample collection guided by computed tomography and magnetic resonance imaging for early detection of osteoarthritis in centrodistal joints of young Icelandic horses. *American Journal of Veterinary Research, 74*(6), pp. 874-887.

Li, G. Y. (2013, December 2). Subchondral bone in osteoarthritis : insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis research & therapy, 15*(223).

Liu, S. Y. (2012, July-August). Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. *Cellular Immunology, 278*(1-2), pp. 35-44.

Loeser, R. (2010, August). Age-related changes in th musculoskeletal system and the development of osteorthritis. *Clinics in geriatric medicine, 3*(26), pp. 371-386.

Loeser, R. S. (2012, June). Osteoarthrisis a disease of the joint as an organ. *Arthrisis & Rheumatism, 64*(6), pp. 1697-1707.

Lotz, M. L. (2012, August). Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone, 2*(51), pp. 241-248.

Mangone, G. O. (2014, June 11). Infiltrative treatment with platelet rich plasma (PRP) in gonarthrosis. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism, 11*(1), pp. 67-72.

Martel-Pelletier, J. (2004). Pathophysiology of osteoarthritis. *OsteoArthritis and Cartilage*(12), pp. 31-33.

McCluskey, M. K. (2004, April). Clinical use of triamcinolone acetonide in the horse (205 cases) and the incidence og glucocorticoid-induced laminitis associated with its use. *Equine Veterinary Education, 16*(2), pp. 86-89.

McCoy, A. T. (2013, November). Articular osteochondrosis: a comparison of naturally-occurring human and animal disease. *Osteoarthritis and Cartilage, 21*(11), pp. 1638-1647.

McIlwraith, C. (2010, April 26-27). Management of joint disease in the sport horse. *17th Kentucky Equine Research Nutrition Conference* (pp. 61-81). Lexington: Kentucky Equine Research.

McIlwraith, C. (2011). Osteochondrosis. Dans G. Baxter, *Adams and Stashak's Lameness in horses* (éd. sixth edition, pp. 1155-1164).

MCIlwraith, C. F. (2012, November 1). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & Joint Research, 11*(1), pp. 297-309.

McIlwraith, C. T. (1996). General pathobiology of the joint and response to injury. Dans G. Trotter, *Joint Disease in the horse* (pp. 237-256). Philadelphia: Saunders.

McIlwraith, C. W. (2001). Disease processes of synovial membrane fibrous capsule, ligaments, and articular cartilage. *AAEP Proceedings, 47*.

McLauchlan, G. a. (2001, October 10). Sacral and iliac articular cartilage thickness and cellularity : relationship to subchondral bone end-plate thickness and cancellous bone density. *Rheumatology*, pp. 375-380.

Menard, C. R. (2015). *Aging of articular cartilage : surface topography, microarchitecture and biomechanical properties of equine cartilage.* Basic science / Cartilage imaging and functional testing.

Minonzio, G. C. (2014, October). Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology, 69*(2), pp. 211-216.

Miura, M. M.-N. (2006, April). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem cells, 24*(4), pp. 1095-1103.

Mobasheri, A. K. (2014, July). Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas, 78*(3), pp. 188-198.

Moreau, M. R. (2011, June 21). Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis research & therapy, 13*.

Moreno, M. C. (2000, April). Processing of noninflammatory synovial fluids with hyaluronidase for cytospin preparations improves the accuracy of differential counts. *Diagnostic cytopathology, 22*(4), pp. 256-258.

Morrison, S. S. (2008, February 22). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell, 132*(4), pp. 598-611.

Muehleman, C. K. (2000). Distribution of cartilage thickness on the head of the human first metatarsal bone. *Journal of Anatomy*(197), pp. 687-691.

Müller-Gerbl, M. (1998). The subchondral bone plate. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, pp. 1-134.

Murillo, Y. A.-G. (2014, May 7). Health related quality of life in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, diabetes mellitus, end stage renal disease and geriatric subjects. Experience from General Hospital in Mexico. *Reumatologia Clinica*.

Murray, R. W. (1999, Juin). The effect of training on the calcified zone of equine middle carpal articular cartilage. *Equine Veterinary Journal*, pp. 274-278.

Nauta, A. F. (2007, November 15). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood, 110*(10).

Neidhart, M. H. (1997). Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *British of journal of rheumatology, 36*, pp. 1151-1160.

Noble, P. C.-B. (2010, Avril 23). L'articulation synoviale : un système tribologique parfait. *Annales de Médecine Vétérinaire*, pp. 83-93.

Nocker, A. C. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. (Elsevier, Éd.) *Journal of Microbiological Methods*(67), pp. 310-320.

Norrdin, R. K. (1999, Février). Calcified Cartilage Morphometry and Its Relation to Subchondral Bone Remodeling in Equine Arthrosis. *Bone, 24*(2), pp. 109-114.

Oegema, T. T. (1995). The histopathology and pathobiochemistry of cartilage-bone interface in osteoarthritis. *Osteoarthritic disorders, Academy of orthopaedic surgeons*, 205-217.

Oei, E. V. (2014, February 27). Quantitative radiological imaging techniques for articular cartilage composition : Toward early diagnosis and development of disease-modifying therapeutics for osteoarthrisis. *Arthrisis Care & Research*, p. 57.

Ogawa, H. K. (2014, January 15). Mechanical motion promotes expression of Prg4 in articular cartilage via multiple CREB-dependent, fluid flow shear stress-induced signaling pathways. *Genes & Development*, pp. 127-139.

Pelletier, J. T.-P. (2011, January). Treatment with tiludronic acid helps reduce the development of experimental osteoarthritis lesions in dogs with anterior cruciate ligament transection followed by reconstructive surgery: a 1-year study with quantitative magnetic resonance imaging. *Journal of Rheumatology, 1*(38), pp. 118-128.

Piel, M. K.-J. (2014, March 10). Pain assessment in animal models of osteoarthritis. *Gene, 537*(2), pp. 184-188.

Poircuitte, G. (2004). *Le tiludronate : mode d'action et utilisation thérapeutique dans l'espèce équine en pathologie locomotrice.* Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Poitras, E. H. (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in biology and biotechnologie, 2*(2), pp. 2-11.

Poole, A. K. (2001, October). Composition and structure of articular cartilage : a template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics & Related Research, 391*, pp. 26-33.

Remy, D. (2012). Maladie de Legg-Perthes-Calves. *Cours de chirurgie des carnivores - Appareil locomoteur*, (pp. 3-6).

Revenaugh, M. (2005, December). Extracorporeal shock wave therapy for treatment of osteoarthritis in the horse : clinical applications. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice., 3*(21), pp. 609-625.

Ribeiro, J. P. (2014, July 11). Cell therapy with human MSCs isolated from the umbilical cord Wharton jelly associated to a PVA membrane in the treatment of chronic skin wounds. *International journal of medical sciences, 11*(10), pp. 979-987.

Riggs, C. (2006). Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse. *Equine Veterinary Education, 18*(2), pp. 100-112.

Robinson, N. S. (2009). *Current therapy in equine medicine* (Vol. 6). Elsevier Health Science.

Roemhildt, M. B.-M. (2012, October). Tissue modification of the lateral compartment of the tibio-femoral joint following in vivo varus loading in the rat. *Journal of biomechanical engineering, 10*(134).

Roquet, I. S. (2012, October 29). The effect of blood contamination on equine synovial fluid analysis. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology, 25*(6), pp. 460-465.

Roughley, P. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *European Cells and Materials, 12*, pp. 92-101.

Roux, S. L. (2011, Février). Cellules stromales mésenchymateuses : propriétés biologiques et perspectives thérapeutiques. *Transfusion clinique et biologique, 18*(1), pp. 1-12.

Sawitzke, A. (2013, April). Personalized medicine for osteoarthritis : where are we now ? *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, 5*(2), pp. 67-75.

Scanzello, C. G. (2012, August). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *National Institute of Health*(51), pp. 249-257.

Schmidt, T. G. (2007, March). Boundary Lubrication of Articular Cartilage : Role of Synovial Fluid Constituents. *Arthrisis & Rheumatism, 56*(3), pp. 882-891.

Schnabel, L. F. (2013). Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? (Elsevier, Éd.) *The Veterinary Journal*(197), pp. 570-577.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells, 4*(1-2), pp. 7-25.

Schwarz, I. H. (1998). Surface-active phospholipid as the lubricating component of lubricin. *British Journal of Rheumatology, 37*, pp. 21-26.

Seantier, B. K. (2009, April 9). Influence of mono- and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption. *Langmuir, 25*(10), pp. 5767-5772.

Serres, E. (2013). *Principales affections héréditaires de l'appareil locomoteur du cheval : état de l'art et perspectives.* Toulouse, France: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Shaer, A. A. (2014, September-October). Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cells derived from placental decidua basalis; umbilical cord Wharton's jelly and amniotic membrane. *Pakistan journal of medical sciences, 30*(5), pp. 1022-1026.

Smith, L. T. (2000). Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology, 1-2*(37), pp. 95-107.

Smith, M. (2011). The normal synovium. *The Open Rheumatology Journal*, pp. 101-106.

Somma, M. (2006). *Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés.* Institut pour la Santé et la Protection des Consommateurs du Centre Commun de Recherche de la Commission Européenne et le Programme de Sécurité Alimentaire du Centre Européen pour l'Environnement et la Santé de l'Organisation Mondiale de la Santé . Rome: Communautés Européennes.

Song, H. L. (2010, January). Lysophosphatidic acid mediates migration of human mesenchymal stem cells stimulated by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Biochimica et biophysica acta - Moleculat and cell biology of lipids, 1801*(1), pp. 23-30.

Sundin, M. O. (2006, June). Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone marrow transplantation, 37*(11), pp. 1051-1059.

Takeba, Y. S. (2001, October 28). Endorphin and enkephalin ameliorate excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, pp. 2176-2183.

Tamba, G. (2005). Le diagnostic de l'arthrose du membre du cheval. *(2005-TOU 3-4008)*, 14-16. Toulouse.

Textor, J. (2011, August). Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries : platelet-rich plasma and IL-1 receptor antagonist protein. *Veterinary Clinics of North America : Equine Practice, 27*(2), pp. 275-298.

Ticiana, M. (2008). *Analysis of cartilage wear particles in equine joints and their relationship to several joint diseases.* Berlin, Allemagne: Freie Universitat Berlin.

Tiwari, N. C. (2010, September/October). Imaging of normal and pathologic joint synovium using nonlinear optical microscopy as a potential diagnostic tool. *Journal of Biomedical Optics*(5), p. 10.

Trotter, M. &. (1996). *Joint Disease in the Horse.* Philadelphia, Pennylvania, USA: W.B Saunders Company.

Trunfio-Sfarghiu, A. Y. (2006). Analyse du rôle tribologique des interfaces lipidiques à partir de la reconstitution ex vivo d'une articulation humaine. Dans *Tribologie et couplages multiphysiques.* Lille, France.

Van Loon, V. S. (2014, July 29). Clinical follow-up of horses treated with allogeneic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendon and ligament disorders. *The Veterinary quarterly*, pp. 1-17.

Vézina, R. L.-L. (2013). Inflammatory stimuli differentially modulate the transcription of paracrine signaling molecules of equine bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Osteoarthritis ans Cartilage* (21), pp. 1116-1124.

Viel, E. B. (2006). AINS, inhibiteurs de la COX 2. Dans *Evaluation et traitement de la douleur* (pp. 603-616). Elsevier Masson.

Wagner, W. H. (2008, May 21). Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. (T. Zwaka, Éd.) *Plos one, 3*(5).

Waller, K. Z. (2013, April 9). Role of lubricin and boundary lubrification in the prevention of chondrocyte apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, p. 15.

Wang, P. L. (2014, January). Effect of extracorporel shock wave therapy on cartilage and subchondral bone remodeling in rabbits with ACLT-induced osteoarthritis. *Journal of Sichuan University. Medical science edition., 1*(45), pp. 120-125.

Weigel, D. M. (2002, September). High-energy fractures of the tibial plateau. Knee function ofter longer follow-up. *The Journal of bone and joint surgery. American volume, 9*(84-A), pp. 1541-1551.

Weinberger, T. (2008, March). Klinische erfahrungen mit der anwendung von ACS/Orthokin/IRAP beim Pferd. *Pferde Spiegel, 11*(3), pp. 111-114.

Weisbrode, S. (2006). Bone and Joint. Dans *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (éd. 4th, p. 1052). Saint Louis: Mosby Elsevier.

Wick, M. K. (2014, April 17). Clinical imaging assessments of knee osteoarthritis in the elderly : a mini-review. *Gerontology, 60*(5).

Wroblewski, A. M. (2010). Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Operative techniques in orthopaedics, 20*, pp. 98-105.

Yamanokuchi, K. T. (2009, january). Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. *Equine veterinary journal, 41*(1), pp. 41-46.

Yanagida-Suckawa, T. T. (2013). Synthesis of hyaluronan and superficial zone protein in synovial membrane cells modulated by fluid flow. *European Journal of Oral Sciences, 121*, pp. 566-572.

Yang K.G., R. N. (2008, April). Autologous interleukin-1 receptor antagonist improves function and symptomes in osteoarthritis when compared to placebo un a prospective controlled trial. *Osteoarthritis and cartilage, 16*(4), pp. 498-505.

Zappone, B. R. (2007, March 1). Adsorption, lubrication, and wear of lubricin on model surfaces. *Biophysical Journal, 92*(5), pp. 1693-1708.

Zhao, Z. J. (2012, November). Extracorporeal shock-wave therapy reduces progresson of knee osteoarthritis in rabbits by reducing nitric oxide level and chondrocyte apoptosis. *Archives of orthopaedic and trauma surgery, 11*(132), pp. 1547-1553.

# Annexes

**Annexe 1 :** *LS pathologiques - récapitulatif des informations concernant les animaux prélevés et résultats des analyses initiales*

| **Numéro attribué au cheval** | **Sexe Race** | **Age** *(au moment du prélèvement)* | **Antécédents pathologiques / anomalies à l'admission** | **Pathologie** | **Traitement antérieur au prélèvement** | **Examens complémentaires** | **Articulation(s) prélevée(s)** | **Caractéristiques du liquide synovial** | **Remarques** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | Jument<br><br>AQPS | 5 ans | NR | - Syndrome articulaire dégénératif majeur et généralisé de l'articulation inter-carpienne gauche<br>→ *traité par arthroscopie*<br><br>- Hématome chronique de la gaine tarsienne avec déchirure focale<br>→ *traité par ténoscopie* | NR | Ø | Carpe droit | *Date du prélèvement : 10 janvier 2013*<br>- 7mL (4 eppendorf)<br>- Jaune claire<br>- Transparent<br>- Viscosité « au doigt » = 5cm<br>- Densité protéique : 1,024 | Colique passagère le lendemain de la chirurgie |
| | | | | | | | Tarse gauche gaine tarsienne | *Date du prélèvement : 10 janvier 2013*<br>- 5,8mL (3 eppendorf)<br>- jaune orangé<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » = 1,5 cm<br>- densité protéique : 1,018 | |
| | | | | | | | Tarse gauche tarsocrurale | *Date du prélèvement : 10 janvier 2013*<br>- 6 mL (4 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » = 6cm<br>- densité protéique : 1,016 | |
| **2** | Hongre<br><br>Selle français | 2 ans | OCD tarse gauche diagnostiquée 1 mois auparavant | OCD des articulations tarso-crurale et métacarpo-phalangienne :<br><br>- multiples fragments sur le tendon intermédiaire de la cochlée tibiale gauche<br><br>- discret fragment en face dorsale du boulet gauche<br><br>→ *traités par arthroscopie* | NR | Radiographies | Tarse gauche | *Date du prélèvement : 7 février 2013*<br>- 12mL (7 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » = 10 cm<br>- densité protéique : 1,018 | Castration de convenance réalisée dans le même temps opératoire que le traitement d'OCD |
| | | | | | | | Boulet postérieur gauche | *Date du prélèvement : 7 février 2013*<br>- 5mL (3 eppendorf)<br>- rosé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » = 20 cm<br>- densité protéique : 1,012 | |
| **3** | Hongre<br><br>Selle français | 6 ans | NR | ***18 février 2013 :***<br>- OCD tarses et boulets postérieurs<br>- dyschondroplasie des trochlées médiales des deux talus<br>- zone suspecte sur P1 du postérieur droit | NR | - Ht, protéines totales, fibrinogène<br>- Radiographies | Tarse droit | *Date du prélèvement : 19 février 2013*<br>- 6 mL (4 eppendorf)<br>- rosé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 5 cm | radiographie de contrôle tarse gauche : fragment face dorsale du tarse en regard de l'os central du tarse → |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | - suspicion fragment intraarticulaire en regard sésamoïde latéral boulet droit non confirmée<br>→ *traités par arthroscopie* | | | | - densité protéique : 1,018 | fragment extra-articulaire ou pris dans la capsule |
| | | | | | | | Tarse gauche | *Date du prélèvement : 19 février 2013*<br>- 4,5 mL (3 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 6 cm<br>- densité protéique : 1,020 | |
| | | | NR | ***21 mai 2013 :***<br>Articulation tarso-crurale gauche : 3 fragments fixes retirés + 1 fragment encapsulé dans l'articulation non retiré<br>→ *traités par arthroscopie* | Voir ci-dessus | - Examen pré-anesthésique (ECG, ventilation forcée)<br>- Radiographies | Tarse gauche | *Date du prélèvement : 22 mai 2013*<br>- 4 mL<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 8 cm<br>- densité protéique : 1,011 | |
| **4** | Entier<br><br>Demi-sang arabe | 6 ans | A l'admission : léger jetage séreux bilatéral, souffle systolique basal grade 1-2/6 plus audible à gauche | - OCD : 2 fragments plantaires sur le boulet postérieur gauche et 1 fragment plantaire médial sur le boulet postérieur droit<br>→ *traités par arthroscopie*<br>- syndrome articulaire dégénératif des 2 boulets postérieurs plus marqué à droite | NR | Radiographies | Tarse droit | *Date du prélèvement : 28 mars 2013*<br>- 2,5 mL (1 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 10 cm<br>- densité protéique : 1,016 | |
| | | | | | | | Tarse gauche | *Date du prélèvement : 28 mars 2013*<br>- 1,5 mL (1 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 6 cm<br>- densité protéique : 1,014 | |
| | | | | | | | Boulet postérieur gauche | *Date du prélèvement : 28 mars 2013*<br>- 0,5 mL (1 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 12 cm<br>- densité protéique : 1,012 | |
| **5** | Hongre<br><br>Selle français | 7 ans | ***Novembre 2008 :***<br>Polysynovite suppurée d'origine indéterminée, probablement suite à une infection systémique par un agent pathogène non identifié, origine | Depuis 2008 : gonflement régulier boulet antérieur gauche + boiterie répond bien aux AINS<br>→ ténosynovite chronique de la gaine digitale + épaississement marqué des tissus sous cutanés<br><br>→ *ténoscopie* | AINS + bandes + argile | Echographie de la gaine digitale | Gaine digitale distale antérieur gauche | *Date du prélèvement : 9 avril 2013*<br><br>- 2,5 mL (2 eppendorf)<br>- jaune foncé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 0 cm<br>- densité protéique : 1,022 | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | immunologique non exclue<br>***Septembre 2010 :*** castration de convenance | | | | | | |
| **6** | Jument<br><br>Selle français | 5 ans | ***15 mars 2013 :***<br>- Plaie contaminée du quadriceps et de l'articulation fémoro-patellaire<br>- Fragment de fracture articulaire à l'aspect proximal de la patella<br>- Fragments osseux provenant d'une large érosion à bord lisse de la lèvre latérale de la trochlée fémorale<br>- Desmopathie sévère du ligament patellaire latéral et desmopathie modérée du ligament patellaire Intermédiaire<br>→ *lavement de l'articulation sous arthroscopie* | 2 mois après la 1ère arthroscopie : arthroscopie fémoro-patellaire pour :<br><br>- Débridement de l'aspect abaxial de la lèvre latérale du fémur avec curetage.<br><br>- Retrait du fragment et curetage du bord proximal de la patelle. | Repos | Radiographies | Grasset droit | *Date du prélèvement : 23 mai 2013*<br><br>- 6 mL (4 eppendorf)<br>- jaune foncé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 4 cm<br>- densité protéique : 1,012 | Suivi 30 septembre 2013 : Persistance d'un fragment osseux minuscule attaché à la capsule articulaire en regard de la lésion de la lèvre latérale de la trochlée fémorale<br><br>→ bonne évolution clinique et radiographique |
| **7** | Hongre | 4 ans | Il y a 2 mois : tuméfaction sévère de l'articulation tarso-crurale droite brutalement au pré | Arthrite traumatique sévère avec une fracture d'avulsion et déchirure des ligaments collatéraux et subluxation médiale de l'articulation tarso-crurale droite<br>→ *arthroscopie : ligament collatéral médial débridé retrait d'un fragment d'avulsion osseux* | Repos | - Echographie & radiographies<br>- Ht, PT, Fibrinogène | Tarse droit | *Date du prélèvement : 30 mai 2013*<br><br>- 9,5 mL (5 eppendorf)<br>- jaune foncé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 1 cm<br>- densité protéique : 1,018 | Pronostic très mauvais : au mieux retraite dans 3 à 6 mois si assez confortable |
| **8** | Jument<br><br>Quarter Horse | 7 ans | Boiterie évoluant depuis 7 mois | Grasset droit : lésions (fibres déchirées) du ménisque médial, érosions profondes et étendues du cartilage du condyle fémoral médial, au niveau de la surface d'appui<br>→ Arthropathie traumatique et dégénérative fémoro-tibiale médiale | Mesures de maréchalerie | Radiographies & échographie | Grasset droit | *Date du prélèvement : 6 juin 2013*<br><br>- 3 mL (2 eppendorf)<br>- rouge<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 0 cm<br>- densité protéique : 1,026 | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | droite avec lésion méniscale<br><br>→ *arthroscopie : débridement des fibres du ménisque médial* | | | | | |
| **9** | Jument<br><br>Selle français | 2 ans | - Novembre 2012 : piroplasmose<br><br>- Boiterie évoluant depuis 9 semaines | articulation métacarpophalangienne gauche : arthrite avec lésions cartilagineuses étendues de grade IV du condyle médial du métatarsien, sur la crête sagittale ainsi que sur une petite zone du bord proximo-dorsal et médial de la première phalange.<br><br>→ *Arthroscopie : débridement du cartilage défectueux, retrait d'un petit fragment composé de débris cartilagineux* | Repos | Echographie + paramètres sanguins | Boulet postérieur gauche | *Date du prélèvement : 11 juin 2013*<br><br>- 10 mL (5 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 3 cm<br>- densité protéique : 1,020 | |
| **10** | Hongre | 6 ans | | Ténosynovite de la gaine digitale du membre antérieur droit<br><br>→ *arthroscopie : desmotomie du ligament annulaire et lavage de la gaine tendineuse* | | Paramètres sanguins | Boulet antérieur droit | *Date du prélèvement : 13 juin 2013*<br>- 5,5 mL (4 eppendorf)<br>- rosé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 8 cm<br>- densité protéique : 1,010 | |
| **11** | Jument<br><br>Croisée anglo-arabe | 5 ans | ***10 juin 2013 :*** diagnostic d'OCD dans les articulations du grasset | *Arthroscopie 2 grassets :*<br>- zones d'arthrose sur les 2 lèvres de la trochlée fémorale ainsi que sur les 2 patella<br>- 1 fragment d'environ 2 mm de diamètre extrait de la lèvre médiale de la trochlée fémorale du grasset droit<br>- 2 fragments d'environ 1 cm et 1,5 cm de diamètre extraits de la zone intertrochléaire du grasset gauche<br>- L'os sous-chondral parait normal<br><br>→ OCD des trochlées latérales des 2 fémurs avec ostéoarthrose généralisée des 2 articulations fémoro-patelallaires | Repos | Radiographies le 10 juin + paramètres sanguins | Grasset droit | *Date du prélèvement : 4 juillet 2013*<br><br>- 6 mL (4 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 10 cm<br>- densité protéique : 1,018 | |
| **12** | Jument<br><br>Selle français | 4 ans | NR | fragment osseux plantaro-médial au niveau du processus plantaire médial de la première phalange du membre postérieur droit<br>→ *traité par arthroscopie* | NR | NR | Boulet postérieur droit | *Date du prélèvement : 23 juillet 2013*<br>- 3 mL (2 eppendorf)<br>- jaune clair + traces de sang<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 13 cm | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | - densité protéique : 1,010 | |
| **13** | Arabe | 5 ans | Trébuche, difficultés à maintenir le galop | - fragments d'OCD du tenon intermédiaire de l'articulation tarso-crurale des membres postérieurs droit et gauche<br>- arthropathie dégénérative bilatérale tarsométatarsienne<br>- enthésopathie et desmopathie modérée de l'origine du ligament suspenseur du boulet du postérieur droit<br><br>→ *arthroscopie : retrait des fragments d'OCD des 2 tarses* | NR | Radiographies & échographies | Tarse droit | *Date du prélèvement : 2 septembre 2013*<br><br>- 5,2 mL (3 eppendorf)<br>- jaune foncé + traces de sang<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 0 cm<br>- densité protéique : 1,016 | - Plaie cutanée sur le carpe droit au réveil<br><br>- suivi 4 novembre 2013 : synovite de l'articulation tarso-crurale du membre postérieur droit suite arthroscopie |
| **14** | Jument<br><br>Trotteur français | 2 ans | NR | Jarret droit : OCD sur le tenon intermédiaire du tibia avec plusieurs petits fragments (>5) descendus dans l'articulation intertarsienne proximale<br><br>→ *arthroscopie : retrait des fragments d'OCD* | NR | Radiographies | Tarse droit | *Date du prélèvement : 24 septembre 2013*<br>- 15 mL (4 eppendorf)<br>- jaune orangé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 0 cm<br>- densité protéique : 1,014 | |
| **15** | Etalon<br><br>Frison croisé arabe | 5 ans | NR | Fragment d'OCD en région plantaro-médiale de la première phalange de l'articulation metatarso-phalangienne gauche<br><br>→ *arthroscopie : retrait du fragment d'OCD* | NR | | Boulet postérieur gauche | *Date du prélèvement : 5 novembre 2013*<br>- 1 mL (1 eppendorf)<br>- jaune très clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 1,5 cm<br>- densité protéique : 1,016 | |
| **16** | Hongre<br><br>Trotteur français | 1 an ½ | NR | Jarret droit :<br>- OCD crête intermédiaire du tibia distal droit<br>- hyperthrophie capsule synoviale<br>- discrètes usures cartilagineuses sur les trochlées médiale et latérale du talus<br><br>→ *arthroscopie : retrait de 3 fragments d'OCD* | NR | | Tarse droit | *Date du prélèvement : 6 novembre 2013*<br><br>- 4 mL (2 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 1 cm<br>- densité protéique : 1,016 | |
| **17** | Jument<br><br>Croisée arabe | 11 ans | NR | Arthrite et ténosynovite septique sévère de l'articulation métacarpo-phalangienne gauche et de la gaine digitale<br><br>→ *arthroscopie : lavage articulaire et* | NR | - 2 NF + 1 biochimie de base<br>- 2 analyses cyto-bactériologiques liquide articulaire<br>- échographie | Boulet antérieur gauche | *Date du prélèvement : 7 novembre 2013*<br><br>- 1 mL (1 eppendorf)<br>- orange<br>- opaque | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | *gaine tendineuse* | | - 2 radiographies | | - viscosité « au doigt » : 0 cm<br>- densité protéique : 1,044 | |
| **18** | Hongre<br><br>Trotteur français | 4 ans | NR | Jarret droit :<br>- 3 fragments libres (environ de 0,5 à 1,5 cm) distodorsalement entre les lèvres du talus, probablement issus d'un traumatisme articulaire (entorse)<br>- synovite sévère,<br>- hémarthrose,<br>- lésions cartilagineuses sur les lèvres de la trochlée<br>- communication entre le cul-de-sac dorso-latéralde l'articulation talo-crurale et la poche latéro-plantaire<br><br>→ *arthroscopie : retrait fragments osseux* | NR | Echographie | Tarse droit | *Date du prélèvement : 7 novembre 2013*<br><br>- 10 mL (5 eppendorf)<br>- rouge<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 0,5 cm<br>- densité protéique : 1,022 | |
| **19** | Jument<br>De selle | 5 ans | NR | Boulet antérieur droit :<br>- fragment d'OCD de l'extrémité proximale du tubercule palmaire latéral de la première phalange<br>- très discrète arthropathie dégénérative métacarpo-phalangienne<br><br>→ *arthroscopie : retrait d'un fragment osseux* | NR | Radiographies | Boulet antérieur gauche | *Date du prélèvement : 14 novembre 2013*<br><br>- 5 mL (2 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 2 cm<br>- densité protéique : 1,010 | |
| **20** | Mâle<br><br>SBS Belge | 4 ans | NR | - Ostéochondrose des 2 boulets pelviens avec lésions d'ostéo-arthrose secondaires majeures<br>- 1 fragment impossible à enlever est laissé dans chaque articulation<br><br>→ *arthroscopie : retrait de deux fragments osseux* | NR | Paramètres sanguins + échographie | Boulet postérieur gauche | *Date du prélèvement : 28 novembre 2013*<br>- 3 mL (2 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 1 cm<br>- densité protéique : 1,012 | |
| | | | | | | | Boulet postérieur droit | *Date du prélèvement : 28 novembre 2013*<br>- 5 mL (2 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 0,5 cm<br>- densité protéique : 1,010 | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **21** | Jument<br><br>Selle français | 3 ans | ***4 mars 2013 :***<br>- Diagnostic OCD 2 grassets et boulet postérieur droit suite boiterie intermittente évoluant depuis plus d'1 an<br>- verrue type sarcoïde arrière passage sangle entourée élastique + une verrue face médiale cuisse droite | - OCD assez marquée de la lèvre latérale de la trochlée fémorale droite<br>- OCD discrète de la lèvre latérale de la trochlée fémorale gauche<br>- OCD de la crête sagittale du métatarsien III droit. Discret fragment d'OCD plantaire de l'articulation métacarpophalangienne droite<br>- bilatéralement discrète ébauche d'arthropathie dégénérative métacarpophalangienne<br><br>→ *arthroscopie : retrait d'un fragment osseux dans l'articulation métatarso-phalangienne droite et curetage du cartilage du grasset gauche* | | Radiographies et échographie | Grasset gauche | *Date du prélèvement :* ***5 décembre*** *2013*<br>- 0,2 mL (1 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 2 cm<br>- densité protéique : 1,012 | Retrait de la masse type sarcoïde (≅ 8cm de diamètre) au passage de sangle dans le même temps opératoire le 5 décembre |
| | | | | | | | Boulet postérieur droit | *Date du prélèvement :* ***5 décembre*** *2013*<br>- 3 mL (2 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 2,5 cm<br>- densité protéique : 1,010 | |
| | | | | | | | Boulet postérieur droit 2 | *Date du prélèvement :* ***10 décembre*** *2013*<br>- 4 mL (2 eppendorf)<br>- jaune clair<br>- transparent<br>- viscosité « au doigt » : 3 cm<br>- densité protéique : 1,011 | |
| **22** | Jument<br><br>Selle français | 4 ans | NR | - fragments d'OCD au niveau du tenon intermédiaire du tibia gauche et droit<br>- lésion d'OCD de type I dans l'articulation metatarso phalangienne droite<br>- un fragment d'OCDde type II dans l'articulation metatarso phalangienne gauche<br><br>→ *arthroscopie : retrait d'un fragment d'OCD de taille moyenne sur le tenon intermédiaire du tibia distal gauche & retrait de deux fragments de petites tailles adhérent au ténon intermédiaire droit* | NR | Radiographies | Tarse gauche | *Date du prélèvement : 5 décembre 2013*<br>- 2,5 mL (2 eppendorf)<br>- jaune orangé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 3 cm<br>- densité protéique : 1,010 | |
| | | | | | | | Tarse droit | *Date du prélèvement : 5 décembre 2013*<br>- 3 mL (2 eppendorf)<br>- jaune orangé<br>- opaque<br>- viscosité « au doigt » : 4 cm<br>- densité protéique : 1,012 | |

**Annexe 2 :** *LS sains - récapitulatif des informations concernant les animaux prélevés et résultats des analyses initiales*

| Identification cheval I - Vaquero | Examen clinique | Articulation | Liquide synovial | | Volume *Exemple identif tubes : I-BAG1/4* |
|---|---|---|---|---|---|
| 5 ans<br>Hongre<br>ONC<br><br>Antécédents :<br>inconnus | Rien à signaler<br><br>Sédation IV : 0,45mL détomidine + 0,5mL torbugesic<br>Ajout 0,2mL détomidine en milieu de prélèvements | Boulet antérieur gauche **(BAG)** | Couleur | **Jaune clair** | 6 mL<br>3 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Transparent | |
| | | | Viscosité au doigt | 20cm | |
| | | | Densité protéique | 1,011 | |
| | | Boulet antérieur droit **(BAD)** | Couleur | **Jaune clair** | 8,5 mL<br>4 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | opaque | |
| | | | Viscosité au doigt | 20cm | |
| | | | Densité protéique | 1,012 | |
| | | Boulet postérieur gauche **(BPG)** | Couleur | **Jaune clair** | 7 mL<br>3 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Transparent | |
| | | | Viscosité au doigt | 1,011 | |
| | | | Densité protéique | 20cm | |
| | | Boulet postérieur droit **(BPD)** | Couleur | Rouge | 4 mL<br>2 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Opaque (sang) | |
| | | | Viscosité au doigt | 20cm | |
| | | | Densité protéique | 1,012 | |
| | | Jarret postérieur gauche (articulation tarso-crurale) **(JPG)** | Couleur | Rouge | 6 mL<br>3 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Opaque (sang ++) | |
| | | | Viscosité au doigt | 15cm | |
| | | | Densité protéique | 1,012 | |
| | | Jarret postérieur droit (articulation tarso-crurale) **(JPD)** | Couleur | **Jaune clair** | 7,8 mL<br>4 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Transparent | |
| | | | Viscosité au doigt | 20cm | |
| | | | Densité protéique | 1,011 | |

| Identification cheval II - Renardo | Examen clinique | Articulation | Liquide synovial | | Volume *Exemple identif tubes : II-BAG1/4* |
|---|---|---|---|---|---|
| 6 ans<br>Hongre<br>ONC<br><br>Antécédents : inconnus | Rien à signaler<br><br>Sédation : 0,5 mL détomidine + 0,5 mL de torbugesic<br>Ajout de 0,3 mL de détomidine et 0,5 mL de torbugesic en milieu de prélèvements | Boulet antérieur gauche **(BAG)** | Couleur | **Jaune clair** | 2,9 mL<br>2 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Transparent + sang | |
| | | | Viscosité au doigt | 12 cm | |
| | | | Densité protéique | 1,010 | |
| | | Boulet antérieur droit **(BAD)** | Couleur | **Jaune clair** | 4 mL<br>3 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Transparent | |
| | | | Viscosité au doigt | 10 cm | |
| | | | Densité protéique | 1,010 | |
| | | Boulet postérieur gauche **(BPG)** | Couleur | Rouge | 3 mL<br>2 Eppendorf + 1EDTA |
| | | | Turbidité | Opaque (sang) | |
| | | | Viscosité au doigt | 12 cm | |
| | | | Densité protéique | 1,022 | |
| | | Boulet postérieur droit **(BPD)** | Couleur | Rouge | 2 mL<br>2 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Opaque (sang) | |
| | | | Viscosité au doigt | 15 cm | |
| | | | Densité protéique | 1,012 | |
| | | Jarret postérieur gauche (articulation tarso-crurale) **(JPG)** | Couleur | Rouge | 1 mL<br>2 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Opaque (sang) | |
| | | | Viscosité au doigt | 15 cm | |
| | | | Densité protéique | 1,018 | |
| | | Jarret postérieur droit (articulation tarso-crurale) **(JPD)** | Couleur | **Jaune clair** | 4 mL<br>5 Eppendorf + 1 EDTA |
| | | | Turbidité | Transparent | |
| | | | Viscosité au doigt | 18 cm | |
| | | | Densité protéique | 1,012 | |

**Annexe 3 :** *résumé des informations concernant les gènes cibles et les amorces correspondantes utilisées lors de l'étude cinétique*

| | Target | Forward primer | Reverse primer | Accession NCBI | Amplicon lenght | Amplification protocol | Source |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Pro-inflammatory* | TNF-α | AGAGGGAAGAGTTACCGAATGC | TGCTACAACATGGGCTACAGG | NM_001081819.1 | 107bp | 95°C 10min (polymerase activation) - 55 cycles of 95°C 15s, 55°C 25s, 72°C 35s | R. Vézina Audette and al.- *Inflammatory stimuli differentially modulate the transcription of paracrine signaling molecules of equine bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells* .- Osteoarthritis and Cartilage.-pp 1116-1124.- 21 (2013) |
| | IL1-β | TGTGGAATCGCTGGACATCAA | GCAGAACACCACTTCCTGGTT | NM_001082526.1 | 124bp | 95°C 10min (polymerase activation) - 55 cycles of 95°C 15s, 55°C 25s, 72°C 25s | R. Vézina Audette and al.- Inflammatory stimuli differentially modulate the transcription of paracrine signaling molecules of equine bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells.- Osteoarthritis and Cartilage.- pp 1116-1124.- 21 (2013) |
| *Modulatory* | IL-10 | GAGTGCCTTCAGTAAGCTCCAA | CCGTCCTGGATGCTTCGTTC | NM_001082490.1 | 140bp | 95°C 5min - 40 cycles of 95°C 3s, 60°C 30s, 72°C 15s | V. Gurel et al.- *Streptolysin-O/antibiotics adjunct therapy modulates site-specific expression of extracellular matrix and inflammatory genes in lungs of Rhodococcus equi infected foals* .- Veterinary Research Communications.- pp 145-154.- 37(2).- 2013 June & A. Sanchez-Matamoros and al.- Development and evaluation of a SYBR Green real-time RT-PCR assay for evaluation of cytokine gene expression in horse.- Cytokine.- pp50-53.- 61(1).- 2013 January |
| | IL1Ra | GCCACAGGATGGAAATCCGC | TTGCATCTTGCAGGGTCTCTT | NM_001082525.1 | 116bp | | TH. Hraha and al.- *Autologous conditioned serum : the comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood* .- Equine Veterinary Journal.- pp 516-521.- 43(5).- 2011 September |
| | IDO | CTGTAAGGTCCTGCCAAGCA | CAGACCTTCTGACAGCTGGG | XM_005606447.1 | 160bp | | Exon junction 430/431 (forward primer) on template |
| *Housekeeping* | UBQ | CTCAGGGGTGGCTGTTAGCTTT | ATTGGGGCTAATGGCTGGAGT | NM_001081862.1 | 85bp | | |
| | GAPDH | GTTTGTGATGGGCGTGAACC | TTGGCAGCACCAGTAGAAGC | NM_001163856.1 | | 94°C 3 min - 40 cycles of 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 45s | SL. Ownby and al.- *Expression of pro-inflammatory mediators is inhibited by an avocado/soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate combination.*- Journal of inflammation (London, England).- 2014 March 28 |
| | β-actin | GGACCTGACGGACTACCTC | CACGCACGATTTCCCTCTC | NM_001081838.1 | | 95°C 5min - 40 cycles of 95°C 3s, 60°C 30s, 72°C 15s | A. Sanchez-Matamoros and al.- *Development and evaluation of a SYBR Green real-time RT-PCR assay for evaluation of cytokine gene expression in horse* .- Cytokine.- pp50-53.- 61(1).- 2013 January |
| | 18S | CGGACAGGATTGACAGATTGATA | TGCCAGAGTCTCGTTCGTTA | NR_046271.1 | | | Anna E. Karagianni and al.- *The equine alveolar macrophage : functional and phenotypic comparisons with peritoneal macrophages* .- Veterinary Immunology and Immunopathology.- pp 219-228.- Vol 155 Iss 4.- 2013 October 1 |
| | H2A | ATATTCAGGCCGTGCTGCT | TTTGGGTTTCAAAGCGTTTC | XM_005603621.1 | | | C. De Schauwer and al.- *Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources.*- Stem cell research & therapy.- 5(1).- 2014 January |
| | SDHA | TCCATCGCATAAGAGCAAAG | GGTGGAACTGAACGAACTCC | XM_001490889.4 | | | |

## **Annexe 4 :** *méthode d'extraction d'ARN, descriptif pour un tube – kit Perfect Pure RNA Cell & Tissue de Prime 5*

**Adsorption de l'ARN sur la membrane de silice (ou colonne) :**

1. Pipeter 400µL de lysat dans la colonne de purification
2. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute. Le lysat doit être complètement passé à travers la colonne, sans laisser de matériel résiduel.
3. Transférer la colonne de purification dans un nouveau tube.
4. Ajouter 400µL de solution de lavage 1 dans la colonne de purification. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute.
5. Transférer la colonne de purification dans un nouveau tube.

**Traitement à la DNase afin d'éliminer les éventuelles molécules d'ADN adsorbées sur la membrane de silice :**

6. Appliquer 50µL de solution DNase dans la colonne de purification. Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
7. Ajouter 200µL de solution de lavage DNase dans la colonne.

   *Note :* la solution de lavage DNase doit être ajoutée dans la colonne de purification avant la centrifugation. Ne pas respecter cet ordre entraîne une perte de l'ARN.
8. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute.
9. Ajouter 200µL de solution de lavage DNase à la colonne de purification.
10. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 2 minutes.
11. Transférer la colonne de purification dans un nouveau tube.

**Elimination des derniers éléments résiduels hors ARN :**

12. Ajouter 200µL de solution de lavage 2 dans la colonne de purification.
13. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute.
14. Ajouter 200µL de solution de lavage 2 dans la colonne de purification.
15. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 2 minutes.

**Elution de l'ARN grâce à un tampon à pH spécifique et récupération :**

16. Transférer avec précaution la colonne de purification dans un nouveau tube. Ne pas mettre en contact la colonne de purification avec les déchets du tube.
17. Ajouter 50-100µL de solution d'élution dans la colonne de purification afin d'éluer l'ARN.
18. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 1 minute.
19. Jeter la colonne de purification.
20. Placer le tube contenant l'ARN purifié dans la glace. Stocker l'ARN entre -70°C et -80°C.

**Annexe 5 :** *tampons nécessaires à l'utilisation du kit Equine TNFα ELISA de Thermo Scientific*

- D-PBS: 0.008M sodium phosphate, 0.002M potassium phosphate, 0.14M sodium chloride, 0.01M potassium chloride, pH 7.4, 0.2µm filtered (e.g., Thermo Scientific™ BupH™ Modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Packs, Product No.28374)

- Carbonate-bicarbonate Buffer: 0.2M sodium carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.4, 0.2µm filtered (e.g., BupH Carbonate/Bicarbonate Buffer, Product No.28382)

- Blocking Buffer: 4% BSA, 5% sucrose in D-PBS, 0.2µm filtered OR ELISA Blocker blocking Buffer, Product No.N502

- Reagent Diluent: 4% BSA in D-PBS (pH 7.4), 0.2µm filtered OR Thermo Scientific™

- StartingBlock™ (PBS) Blocking Buffer, Product No.37538

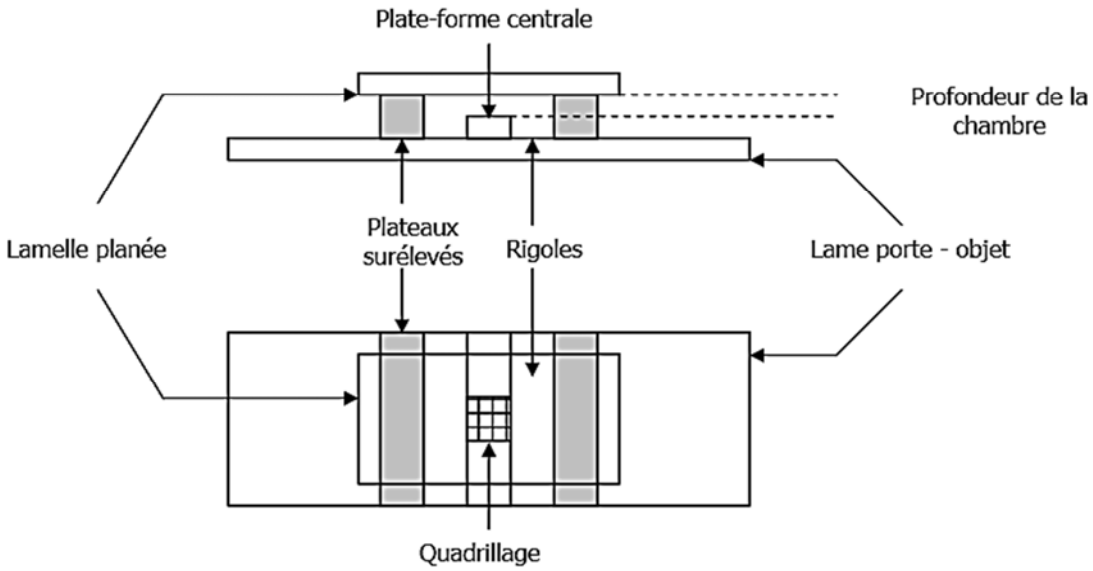
- Wash Buffer: 0.05% Tween™-20 Detergent (e.g., 0.5% Thermo Scientific™ Surfact-Amps™ 20 Detergent Solution, Product No. 28320) in D-PBS, pH 7.4 OR ELISA Wash Buffer (30X), Product No.N503

*Note: Mix new solution daily*

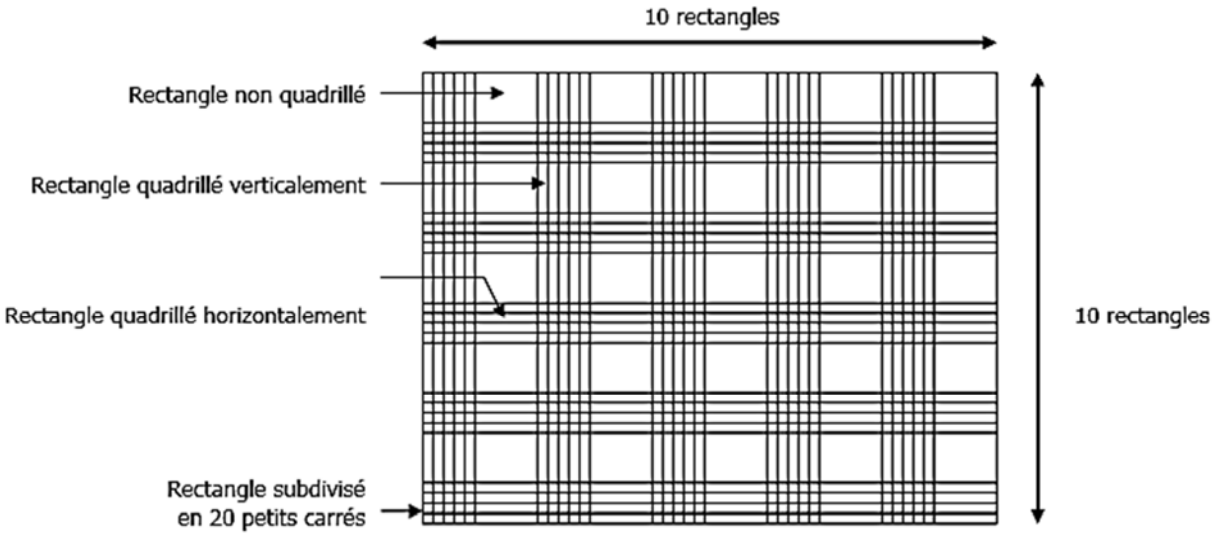
**Annexe 6 :** *principe d'utilisation d'une cellule de Malassez*

## 1) Généralités

Une cellule de Malassez est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu :




La cellule de Malassez possède un cartilage comportant 100 rectangles :




Le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1mm^3$.

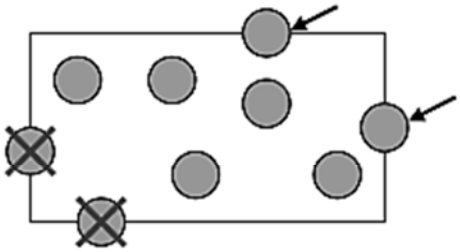
## 2) Remplissage de la cellule de Malassez

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer la lamelle aux plateaux : placer la lamelle sur les plateaux, à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.
- Placer la cellule de Malassez sur une surface plane. Homogénéiser la suspension CSM + bleu Trypan. Prélever la suspension à l'aide d'une pipette. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.

  **/!** Le remplissage doit être fait en une seule fois sans bulle d'air et sans faire déborder la suspension dans les rigoles.

**3) Numération**

- Réaliser le comptage à l'objectif x40 (1 rectangle par champ) : dénombrer les cellules vivantes qui apparaissent incolores (les cellules mortes sont quant à elles colorées en bleu).
- Pour les CSM chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique on choisit de prendre en compte les CSM chevauchant la ligne horizontale supérieure et la ligne verticale droite) :



**Numération sur le rectangle = 7 cellules**

- Après utilisation, la cellule de Malassez doit être rincée avec de l'eau distillée et essuyée avec du papier sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage.

**4) Calcul de la concentration cellulaire**

- Soient :
  - n : le nombre de CSM dénombrées
  - V : le volume de comptage
  - f : le facteur de dilution
  - N : le nombre de CSM par litre

- $N = (n/V) \times f$

**NOM PRENOM** : DUBOIS Elodie

**TITRE :** ELABORATION ET ESSAIS PRELIMINAIRES D'UN PROTOCOLE EXPERIMENTAL IN VITRO PERMETTANT D'EVALUER L'INFLUENCE DE LIQUIDES SYNOVIAUX ISSUS D'ARTICULATIONS ARTHROSIQUES DE CHEVAL SUR LES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES

**Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire :** Lyon, *le 18 septembre 2015*

**RESUME :** L'ostéoarthrose est une maladie complexe touchant l'ensemble de l'organe diarthrosique et admettant une composante inflammatoire centrale. Ses répercussions socio-économiques sont importantes, notamment du fait d'un traitement uniquement symptomatique et insuffisant.

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) s'inscrivent dans des recherches actives menées aujourd'hui pour combattre efficacement l'ostéoarthrose avec l'espoir de réussir à guérir un jour cette maladie. La compréhension de l'action bénéfique des CSM sur les articulations atteintes d'ostéoarthrose reste imprécise. L'hypothèse retenue est que les CSM agiraient au sein de l'organe diarthrosique *via* leurs sécrétions anti-inflammatoires et immunomodulatrices en plus de leur capacité de régénération tissulaire. Elles permettraient ainsi une rupture précoce du cercle vicieux de l'inflammation ostéoarthrosique, limitant de fait les lésions articulaires et favorisant la réparation des lésions tissulaires. On connaît aujourd'hui l'importance capitale du microenvironnement des CSM dans leur physiologie et leur différenciation. Or, les connaissances concernant le liquide synovial en tant que microenvironnement des CSM sont encore approximatives.

Nos essais *in vitro* préliminaires ont permis de valider les étapes d'un protocole d'expérimentation visant à i) caractériser le liquide synovial issu d'articulations ostéoarthrosique et ii) mesurer son influence sur les CSM. Ce protocole permettra de progresser dans la compréhension de l'action des CSM sur l'ostéoarthrose et ainsi d'avancer vers un traitement plus efficace de cette maladie invalidante.

**MOTS CLES :**

- Arthrose
- Cellules souches mésenchymateuses
- Synovie
- Articulation

**JURY :**

| | |
|---|---|
| Président : | Monsieur le Professeur Roland Chapurlat |
| 1er Assesseur : | Madame le Docteur Caroline Boulocher |
| 2ème Assesseur : | Monsieur le Professeur Olivier Lepage |

**DATE DE SOUTENANCE :** 18 septembre 2015

**ADRESSE DE L'AUTEUR :** Les crozes
07110 VINEZAC