

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2015

Thèse n°

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)**

présentée et soutenue publiquement
le 5 Novembre 2015 à POITIERS

par Mademoiselle DANIEL Bertille
Née le 01 Mars 1991

**La thérapie cellulaire, une biothérapie innovante préventive de l'arthrose :
l'intérêt de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux**

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur FAUCONNEAU Bernard

Membres : Monsieur BRILLAULT Julien, Maître de conférences
Monsieur RACHIDI Walid, Maître de conférences

Directeur de thèse : Madame le Professeur PAGE Gylène

PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, pharmacie clinique PU-PH
- MARCHAND Sandrine, pharmacocinétique PU-PH

- CARATO Pascal, chimie thérapeutique PR
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie PR
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie PR
- IMBERT Christine, parasitologie PR
- OLIVIER Jean Christophe, galénique PR
- PAGE Guylène, biologie cellulaire PR
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique PR
- SARROUILHE Denis, physiologie PR
- SEGUIN François, biophysique, biomathématiques PR

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, immunologie-hématologie MCU-PH
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique MCU-PH
- RAGOT Stéphanie, santé publique MCU-PH
- THEVENOT Sarah, hygiène et santé publique MCU-PH

- BARRIER Laurence, biochimie MCF
- BODET Charles, bactériologie MCF
- BON Delphine, biophysique MCF
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie MCF
- CHARVET Caroline, physiologie MCF
- DEBORDE-DELAGE Marie, sciences physico-chimiques MCF
- DEJEAN Catherine, pharmacologie MCF
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique MCF
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire MCF
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie, MCF

- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie MCF
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique MCF
- INGRAND Sabrina, toxicologie MCF
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile pharmacochimie MCF
- PAIN Stéphanie, toxicologie MCF
- RIOUX BILAN Agnès, biochimie MCF
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacochimie MCF
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire MCF
- WAHL Anne, chimie analytique MCF

Maîtres de Conférences Associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

Attaché Temporaire d'Enseignement et de recherche (ATER)

COSTA Damien, microbiologie

Professeur 2nd degré - anglais

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - anglais

- JORDAN Stephen

Contractuel enseignant - anglais

- SASU Elena

REMERCIEMENTS



Je tiens à remercier en premier lieu Monsieur le Professeur Bernard FAUCONNEAU pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury. Je le remercie pour ses enseignements au cours de mes années d'études, ainsi que pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé dans son laboratoire lors de mon stage.

Je remercie très particulièrement Madame le Professeur Guylène PAGE pour sa disponibilité, ses encouragements et son aide précieuse tout au long de la rédaction de cette thèse. Je lui suis d'autant plus reconnaissante pour la qualité de ses enseignements. Elle a su transmettre bien plus que des connaissances théoriques : le goût de la recherche dans le domaine des biotechnologies.

Je présente mes respectueux remerciements au Docteur Walid RACHIDI, pour avoir accepté de juger ce travail et m'avoir accordé du temps afin d'assister à la soutenance. Je le remercie également pour m'avoir permis de finaliser mes études en intégrant le Master 2 Biothérapies à l'Université de Grenoble.

Je remercie Monsieur Julien BRILLAULT pour avoir accepté de prendre part au jury et ainsi d'évaluer mon travail.

Merci à l'équipe de STEM CIS et à l'équipe de l'animalerie du CYROI qui m'ont permis de réaliser mon stage de fin d'études et de participer à une étude *in vivo*.

J'adresse ma plus sincère reconnaissance à Madame Christine GIRAUD ainsi qu'à Monsieur Etienne ANDRE, pour m'avoir soutenue dans toutes les épreuves que j'ai pu traverser et m'avoir permis de me construire professionnellement mais aussi personnellement. Les mots me manquent pour exprimer toute l'estime que je leur porte à sa juste mesure.

Messieurs MONTILLET et GARGAUD, pharmaciens d'officine, j'adresse toute ma gratitude pour leur soutien et leur aide précieuse tout au long de mes études.

Un grand merci à Madame Sabrina INGRAND et à Mademoiselle Anastasia NOEL pour m'avoir initiée aux travaux de recherche fondamentale et m'avoir ainsi permis de trouver ma voie.

Mes premières pensées personnelles vont à mes très chers parents, Martine et Patrick. Je ne sais comment vous remercier pour cette aventure et la vie que vous m'offrez. Les valeurs que vous m'avez transmises sont des alliés indispensables dans mon quotidien. Vous m'avez ouvert la voie des possibles, et j'espère honorer nos engagements.

À mon petit frère Kévin, et aux autres membres de ma famille, pour le soutien et la cohésion dont nous faisons preuve. Laura et Christine, ma seconde famille, pour votre énergie fluide, votre aide psychologique à tous les niveaux.

Ces six années m'ont permis de rencontrer des personnes formidables, qui depuis le début marchent toujours à mes côtés ; parmi elles je citerai plus particulièrement Lucie et Floriane. Lucie, avec ta gentillesse inestimable, un immense merci pour tous nos moments de partage inoubliables. Floriane, avec ta sagesse pleine de folie, malgré ton abandon en première année, merci d'avoir toujours répondu présente. Vous avez été là, dans les bons et les moins bons moments, et tout comme ma petite boule de poils nomade Schwepps, vous avez contribué à mon bonheur quotidien. Sans oublier ceux qui, sans les citer, se reconnaîtront. La réussite est étroitement liée à l'épanouissement, auquel cas, je leur dois beaucoup.

Je clôture ces remerciements par une pensée pour mes Grands-parents, partis bien trop tôt, pour m'avoir tant donné, tant appris, pour qu'ils soient fiers...

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
I. LA THERAPIE CELLULAIRE	2
I.1 Médecine régénérative et concept de thérapie cellulaire	2
I.2 Les cellules souches	3
I.2.1 Leurs caractéristiques.....	3
I.2.2 Classification selon leur potentiel de différenciation.....	4
I.2.2.1 Les cellules souches totipotentes	4
I.2.2.2 Les cellules souches pluripotentes	5
I.2.2.3 Les cellules souches multipotentes	5
I.2.2.4 Les cellules souches oligopotentes	5
I.2.2.5 Les cellules souches unipotentes	5
I.2.3 Classification selon leur origine.....	6
I.2.3.1 Les cellules souches embryonnaires	6
I.2.3.2 Les cellules souches adultes.....	7
I.2.3.3 Les cellules souches fœtales	8
I.2.3.4 Les cellules souches induites	8
I.3 Les cellules souches mésenchymateuses	10
I.3.1 Leurs caractéristiques.....	11
I.3.2 Leurs sources	12
I.3.3 Leurs fonctions.....	12
I.4 Les succès de la thérapie cellulaire	15
I.4.1 Les thérapies cellulaires approuvées.....	15
I.4.2 Les essais cliniques	16
I.4.2.1 Les cellules souches pluripotentes	16
I.4.2.2 Les cellules souches mésenchymateuses	17
II. L'ARTHROSE.....	19
II.1. L'articulation.....	19
II.1.1 Le cartilage articulaire	20
II.1.2 La capsule articulaire et synoviale.....	22

II.2 Les atteintes de l'articulation dans l'arthrose	23
II.2.1 Le cartilage	23
II.2.2 L'os sous-chondral.....	24
II.2.3 La capsule articulaire.....	24
II.3 Les différents types d'arthrose.....	25
II.4 Epidémiologie.....	26
II.4.1 Santé publique	26
II.4.2 Facteurs de risques.....	27
II.4.3 Pharmaco-économie	28
II.5 Diagnostic	30
II.5.1 Diagnostic Clinique	30
II.5.2 Imagerie Médicale	31
II.6 Traitements	33
II.6.1 Recommandations de prise en charge	33
II.6.2 Traitements pharmacologiques	35
II.6.2.1 Le paracétamol	35
II.6.2.2 Les AINS	35
II.6.2.3 Autres.....	36
II.6.3 Traitements chirurgicaux	37
II.6.4 Nouvelles approches : les Biothérapies	38
II.7 Stratégies de thérapie cellulaire dans le modèle de l'arthrose.	39
II.7.1 Différents projets de recherche en cours	39
II.7.2 Choix des cellules.....	40
II.7.3 Ingénierie tissulaire associée	42
 III. PARTIE EXPERIMENTALE : ETUDE DE L'INJECTION DE LA FRACTION STROMALE VASCULAIRE EXTRAITE DE TISSU ADIPEUX DANS UN MODELE D'ARTHROSE CHEZ LE RAT	 43

Introduction	44
III.1 Description de l'étude	44
III.1.1 Design de l'étude.....	45
III.1.2 Conditions expérimentales testées	46
III.2 Matériel & Méthodes	47
III.2.1 Animaux	47
III.2.2 Modèle expérimental de l'arthrose.....	48
III.2.3 Suivi des animaux	51
III.2.4 Immunosuppression	51
III.2.5 Patients et Prélèvements de tissu adipeux	52
III.2.6 Extraction des cellules de la fraction stromale vasculaire de tissus adipeux	52
III.2.7 Injection intra-articulaire.....	53
III.2.8 Bio-polymères	54
III.2.9 Analyse par imagerie : micro-CT	54
III.2.10 Analyse histologique	58
III.2.11 Statistiques.....	60
III.3 Résultats	60
III.3.1 Suivi des Animaux	60
III.3.2 Analyses Imagerie micro-CT	62
III.3.3 Analyses Imagerie Histologique.....	66
III.4 Discussion	66
CONCLUSION & PERSPECTIVES	71
BIBLIOGRAPHIE	73
REFERENCES INTERNET	77

Liste des Abréviations

3D :	tridimensionnelle
AASAL :	Anti-Arthrosique Symptomatique d'Action Lente
AINS :	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
ASC :	Adipose Stem Cells
BPF :	Bonnes Pratiques de Fabrication
CD :	Cluster de Différenciation
COX :	Cyclo-OXYgénase
CSM :	Cellules Souches Mésenchymateuses
CT :	Computed Tomography
CTX-II :	C-terminal Telopeptide of collagen type II
CYROI :	Cyclotron Réunion Océan Indien
DM :	Dispositif Médical
ES ou ESC :	Embryonic stem cells
EULAR :	the EUropean League Against Rheumatism
EVA :	Echelle Visuelle Analogique
FSV :	Fraction Stromale Vasculaire
GMP :	Good Manufacturing Practices
HLA :	Human Leukocyte Antigen
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IL :	InterLeukine
IMC :	Indice de Masse Corporelle
INSEE :	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
INSERM :	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
iPSCs :	Induced pluripotent stem cells
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique

JO :	Journal Officiel
LCA :	Ligament Croisé Antérieur
LEEM :	Les Entreprises du Médicament
MEC :	Matrice ExtraCellulaire
micro-CT ou μ CT :	micro Computed Tomography
MMP :	MétalloProtéase Matricielle
NI :	Non Injectés
OARSI :	OsteoArthritis Research Society International
ORL :	Oto-Rhino-Laryngologie
PDGF :	Platelet derived growth factor
PFA :	Paraformaldéhyde
PIB :	Produit Intérieur Brut
R&D :	Recherche et Développement
RL :	Ringer Lactate
SEM :	Standard Error of Mean
SFR :	Société Française de Rhumatologie
SOPF :	Specific Opportunist Pathogen Free
TA :	Tissu Adipeux
TNF :	Tumor Necrosis Factor
VEGF :	Vascular endothelial growth factor

Liste des Figures et Tableaux

Figure 1 : Caractéristiques des cellules souches <i>www.cellcan.com</i>	4
Figure 2 : Différents types de cellules souches <i>adapté de Sciences et Avenir</i>	6
Figure 3 : Schéma général concernant les iPSCs <i>Antony-Debré et al. 2013</i>	10
Figure 4 : Fonctions des cellules souches mésenchymateuses <i>adapté de Nixon et al. 2012</i> ...	14
Figure 5 : Thérapie cellulaire pour les Grand Brûlés <i>Pr J.J. Lataillade 2014.</i>	15
Figure 6 : Essais cliniques concernant les cellules souches mésenchymateuses enregistrés au 1er octobre 2015 <i>www.clinicaltrials.gov</i>	18
Figure 7 : Schéma d'une articulation <i>adapté de www.mclef.net.htm</i>	20
Figure 8 : Composition de la Matrice Extracellulaire <i>archives.coordination-nationale-infirmiere.org</i>	21
Figure 9 : Structure histologique du cartilage articulaire <i>www.naturalheightgrowth.com</i>	22
Figure 10 : Les atteintes articulaires de l'arthrose <i>HAS, Pascal Marseaud</i>	25
Figure 11 : Examens radiologiques de genoux de face <i>www.ims77.com</i>	32
Figure 12 : Schéma récapitulatif de l'étude	45
Figure 13 : Schéma d'un genou et localisation du LCA	49
Figure 14 : Localisation du site de Section chirurgical du LCA ; différents ciseaux utilisés...	50
Figure 15 : Différentes coupes exploitées lors du scoring μ -CT	56
Figure 16 : Critères pris en compte pour les scores détaillés	57
Figure 17 : Identification des zones sur une coupe histologique	58
Figure 18 : zones cibles pour le scoring; Cartilage du Fémur latéral; Cartilage du Tibia latéral	59
Figure 19 : Courbes de suivi de poids du lot 1	61
Figure 20 : Reconstruction 3D après analyse micro-CT	62
Figure 21 : Graphiques des résultats de corrélation entre le score μ -CT et : la prise de poids; la durée de l'anesthésie; l'expérimentateur	63
Figure 22 : Graphique des résultats globaux de l'analyse μ -CT	64
Figure 23 : Scores de μ -CT de chaque condition en fonction des zones articulaires	64
Figure 24 : Scores μ -CT pour chaque zone articulaire en fonction des 4 conditions testées...	65
 Tableau 1 : Evolution du coût socioéconomique de l'arthrose <i>Le Pen et al. 2005</i>	 29
Tableau 2 : Critères d'évaluation de l'analyse micro-CT	57
Tableau 3 : Critères d'évaluation de l'analyse histologique	59

INTRODUCTION

Le contexte démographique mondial se modifie, la population vieillie, le nombre de sujets obèses augmente, la qualité de vie diminue. Ce sont autant de facteurs qui aboutissent à l'augmentation d'atteintes pathologiques secondaires. L'augmentation de l'incidence de l'arthrose illustre bien ces changements. Cette pathologie dégénérative des articulations dispose de traitements symptomatiques (antalgiques et anti-inflammatoires) mais à ce jour les traitements curatifs sont insuffisants. Tout ceci fait de cette pathologie un réel enjeu en recherche médicale.

Le domaine de la recherche médicale est en constante évolution, la communauté scientifique ne cesse de découvrir de nouveaux traitements, d'expliquer de nouveaux mécanismes pathologiques permettant d'identifier de nouvelles cibles à visée thérapeutique ou diagnostique. A côté des molécules naturelles, synthétiques ou hémi-synthétiques, la recherche thérapeutique utilise de plus en plus le vivant et a fait naître les biothérapies. L'émergence grandissante de ces biothérapies marque probablement un tournant de l'histoire des solutions thérapeutiques.

La thérapie cellulaire sera abordée dans la première partie, en passant en revue son concept, les différents types de cellules souches avant de se focaliser sur les cellules souches mésenchymateuses. Le succès de cette stratégie thérapeutique innovante et son application dans l'arthrose sera souligné.

Dans la seconde partie, l'arthrose sera détaillée depuis sa physiopathologie jusqu'aux solutions thérapeutiques. L'explication et le choix de la stratégie de thérapie cellulaire par les cellules souches mésenchymateuses clôturera cette partie.

Enfin l'exemple d'une étude préclinique *in vivo* dans un modèle d'arthrose chez le rat, illustrera une des stratégies qui peut être envisagée. Cette étude cible l'effet de l'injection intra-articulaire de cellules de la fraction stromale vasculaire issue de tissu adipeux humain.

I. LA THERAPIE CELLULAIRE

I.1 Médecine régénérative et concept de thérapie cellulaire

Dans une ère de médecine régénérative, où le mythe de Prométhée (Titan destiné à être enchaîné à un rocher, et à se faire dévorer le foie par un aigle. Un supplice infini car chaque nuit son foie se régénérait) devient une réalité scientifique expliquée. La régénération tissulaire, voire même d'un organe, est le résultat des vestiges d'un potentiel que possédaient les espèces primitives. Dans une ère où l'on atteint des limites concernant les molécules synthétiques, les stratégies thérapeutiques se modifient. Tout ceci aboutit à l'émergence et au développement des biothérapies.

Ces biothérapies sont l'utilisation du monde vivant comme outil thérapeutique, cela va de l'utilisation des bactéries pour produire des molécules (anticorps, facteurs de croissance...), à la manipulation des cellules ou des gènes, en passant par la greffe de tissu. Parmi elles, la thérapie cellulaire connaît un essor particulier, ceci grâce notamment aux facilités d'accès et donc d'étude et de manipulation des différents types cellulaires. Cependant il faut garder à l'esprit que la thérapie génique croît au fil des années grâce aux avancées en recherche fondamentale pour améliorer la sécurité d'utilisation de cette stratégie (Séminaires Ketty Schwartz 2010).

La thérapie cellulaire s'inscrit dans une volonté d'évolution de la prise en charge. Une restauration des tissus et de la fonction des organes endommagés, de façon la plus pérenne possible, est envisagée avec un traitement en injection unique de cellules saines et fonctionnelles. Les cellules peuvent provenir du patient lui-même (autologues), ou alors d'un donneur (allogéniques, de la même espèce) ; ceux sont les plus utilisées. D'autres cellules sont à l'étude comme celles issues d'une espèce différente (xénogéniques) ou des lignées cellulaires (cellules immortalisées). Elles peuvent être purifiées, modifiées et amplifiées avant d'être réinjectées. La thérapie cellulaire est utilisée dans trois principaux traitements, en hémato-oncologie, en immunothérapie et en médecine régénérative (maladies dégénératives et pathologies impliquant la destruction de cellules, tissus ou organes). Les moyens investis sont considérables pour ces stratégies prometteuses (Etude Bionest/LEEM 2010 ; Séminaires Ketty Schwartz 2010).

Le domaine de la thérapie cellulaire tente d'adapter les processus de régénération des tissus à des fins thérapeutiques et se base sur les caractéristiques essentielles des cellules souches de différents types, mais peut aussi faire intervenir des cellules partiellement ou totalement différenciées. La thérapie cellulaire débute avec la transfusion sanguine et la greffe de moelle osseuse, ceci constitue les prémices de toutes les études suivantes jusqu'à atteindre aujourd'hui la reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches. De plus en médecine régénérative, la thérapie cellulaire peut être associée à de l'ingénierie tissulaire afin de contourner certaines limites. Ce domaine étant vaste, ce travail se limitera à l'utilisation principalement des cellules souches mésenchymateuses.

Un autre aspect concernant cette thérapie cellulaire, utilisée comme outils de médecine régénérative, est l'obtention des cellules avec suffisamment de sécurité pour une utilisation clinique. Les difficultés se trouvent à plusieurs niveaux ; le premier est la composition du milieu de culture cellulaire, qui doit permettre une différenciation homogène et stable, même après implantation, et qui doit être compatible avec une utilisation chez l'Homme. Le second niveau concerne les protocoles, ils doivent suivre les normes dictées par les autorités définissant les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF, ou GMP « Good Manufacturing Practices »). Enfin des contraintes supplémentaires sont appliquées si une partie de thérapie génique intervient dans la stratégie thérapeutique (Site internet de l'INSERM).

I.2 Les cellules souches

I.2.1 Leurs caractéristiques

C'est au début des années 1960 que les cellules souches hématopoïétiques ont été identifiées et caractérisées par les travaux de James Till et Ernest McCulloch. Depuis les recherches n'ont cessé de mettre en évidence et d'exploiter leurs caractéristiques mais aussi d'identifier de nouvelles origines.

Les cellules souches sont une population hétérogène des cellules indifférenciées caractérisées par deux potentiels :

- L'auto-renouvellement : la possibilité pour les cellules filles issues de la division de la cellule souche mère de conserver les propriétés et caractéristiques de cellules souches, assurant ainsi le maintien d'un pool de cellules souches indifférenciées disponibles.

- La différenciation cellulaire : la capacité de s'orienter vers un ou plusieurs types cellulaires afin de générer des cellules différenciées fonctionnelles constitutives des tissus et organes.

Ces caractéristiques montrent le potentiel de division asymétrique, donnant lieux à des cellules filles différentes de la cellule mère (Figure 1). La capacité de différenciation ainsi que l'origine sont différentes selon les cellules et permettent d'établir une classification (Smith, 2006).

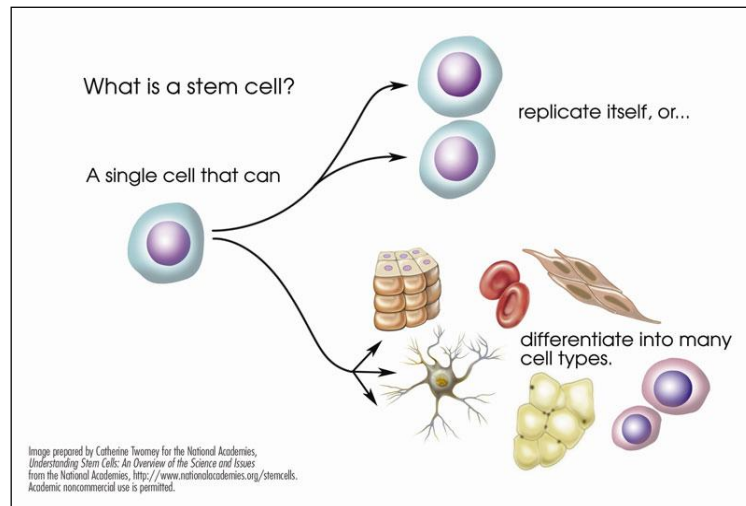


Figure 1: Caractéristiques des cellules souches : la division symétrique correspond à l'auto-renouvellement, la division asymétrique abouti à la différenciation cellulaire. - www.cellcan.com

I.2.2 Classification selon leur potentiel de différenciation

Cette classification est la plus couramment utilisée, cependant les désignations employées sont en discussion au sein de la communauté scientifique. Les cellules souches peuvent être séparées en quatre catégories, allant du potentiel de différenciation le puissant au plus restreint (Figure 2).

I.2.2.1 Les cellules souches totipotentes

La totipotence peut être décrite comme la capacité d'une cellule à se différencier à la fois en tous les types cellulaires issus des feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme) mais aussi en annexes embryonnaires (le placenta). Ainsi une cellule totipotente a le pouvoir de générer un organisme dans sa globalité. Cette caractéristique ne concerne que très peu de cellules, il s'agit des blastomères issus de la fécondation et la formation du zygote, jusqu'au stade de blastocyste.

I.2.2.2 Les cellules souches pluripotentes

La définition de la pluripotence est la capacité d'une cellule à se différencier en tous les types cellulaires, excepté les annexes embryonnaires. Les cellules possédant cette caractéristique sont donc incapables de reproduire un organisme complet. Les cellules de la masse interne de blastocyste, cellules souches embryonnaires, possèdent cette caractéristique de façon constitutive. Cependant, la reprogrammation de cellules somatiques, aboutissant aux cellules souches induites, permet d'obtenir cette pluripotence.

I.2.2.3 Les cellules souches multipotentes

Les cellules dites multipotentes sont déjà engagées dans une voie de différenciation. En effet, elles ne sont capables de produire que des cellules issues du même feuillet embryonnaire, elles sont « déterminées ». Ceux sont les cellules souches fœtales et adultes (présentes aussi chez le nouveau-né). Les plus connues sont les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses.

I.2.2.4 Les cellules souches oligopotentes

Les cellules souches oligopotentes sont les cellules capables de générer quelques types cellulaires d'un tissu donné. Par exemple, les cellules souches de la peau peuvent donner des cellules épidermiques, des glandes sébacées, des follicules pileux.

I.2.2.5 Les cellules souches unipotentes

La capacité de différenciation la plus faible est l'unipotence, c'est-à-dire la différenciation en un seul type cellulaire. Ces cellules conservent leur capacité d'auto-renouvellement. Elles sont présentes dans les tissus et sont issues de cellules multipotentes s'engageant dans la différenciation en une lignée cellulaire, ceux sont les précurseurs ou progéniteurs.

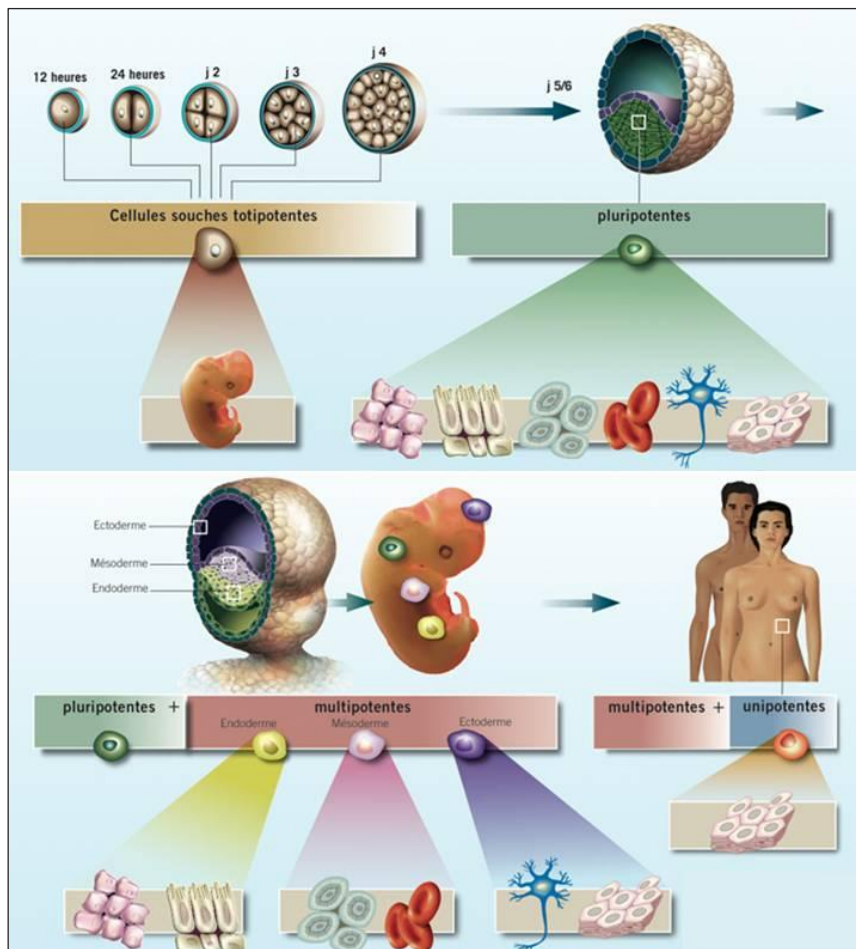


Figure 2 : Différents types de cellules souches : en fonction de leur capacité de différenciation
 – Adapté de l'infographie de Michèle Dehoky pour Sciences et Avenir

I.2.3 Classification selon leur origine

Cette classification est moins utilisée. Les cellules souches étant présentes dès le début de l'embryogénèse et jusqu'à l'âge adulte, la définition des classes est fonction du stade de développement. Cette classification permet d'appliquer l'éthique qui se rapporte à l'utilisation de chaque type de cellules souches. Il existe quatre catégories.

I.2.3.1 Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires, aussi appelées cellules « ES » ou « ESC » (pour embryonic stem cells), sont issues de la masse interne de l'embryon au stade « blastocyste » à J5-7. Elles disposent d'une capacité de différenciation illimitée, elles peuvent donner tous les types cellulaires de chacun des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) excepté les annexes embryonnaires. Cette pluripotence est approuvée *in vivo* lors

de l'injection de cellules souches embryonnaires, des tératomes se développent. Cette pluripotence est aussi leur limite d'utilisation, *via* les processus de tumorigénèse.

Ces cellules sont aussi facilement cultivables *in vitro*. Elles ont donc fait preuve d'un grand intérêt pour la communauté scientifique, tant pour la recherche sur le développement humain et ses pathologies, que pour la thérapeutique et la médecine régénérative (Biswas et al. 2007).

Cependant leur obtention nécessite la destruction de l'embryon, alors afin de limiter les dérives d'utilisation, des mesures réglementaires ont été mises en place. Selon la loi de Bioéthique du 7 juillet 2011, il est interdit de produire des embryons à des fins de recherche, les embryons utilisés sont les embryons surnuméraires issus de l'assistance médicale à la procréation. La recherche sur les embryons ou les cellules souches embryonnaires est interdite, mais une dérogation limitée à cinq ans peut être délivrée après étude minutieuse du dossier par l'Agence de la Biomédecine. Aux vues des avancées scientifiques, la LOI n° 2013-715 du 6 août 2013 autorise sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires (JO du 7 août 2013).

I.2.3.2 Les cellules souches adultes

Les cellules souches adultes, quant à elles, ne disposent que d'une capacité de différenciation limitée, soit aux types cellulaires issus du même feuillet embryonnaire (multipotentes), soit aux types cellulaires d'un tissu donné (oligopotentes), soit à un type cellulaire (unipotentes). Elles sont largement distribuées dans l'organisme, cependant leur accessibilité est différente selon les organes, leur quantité et leur identification rendent leur utilisation difficile.

Les cellules souches adultes les plus employées, en recherche mais aussi en thérapeutique, sont les cellules souches hématopoïétiques (à l'origine de toutes les cellules composant le sang) ainsi que les cellules souches mésenchymateuses (à l'origine des tissus comme l'os, les muscles, le tissu adipeux, elles seront plus détaillées dans la partie suivante). Il existe aussi des cellules souches neurales, épithéliales et épidermiques. La fonction principale de ces cellules est d'assurer l'homéostasie des tissus en fonction de la vitesse de régénération de chaque organe. Une fonction paracrine est également décrite, la sécrétion de cytokines et autres facteurs de croissance aurait des effets tissulaires (Gnecchi et al. 2008).

Ces cellules sont soumises, comme toutes les autres, à la sénescence physiologique. Ceci implique un ralentissement du renouvellement tissulaire et donc la dégénérescence normale des organes. C'est le cas par exemple de l'arthrose ou de la dégénérescence maculaire, ces maladies font l'objet d'essais cliniques de thérapie cellulaire. Leur principale limite d'utilisation est leur pouvoir immunogène (Site internet de l'INSERM).

I.2.3.3 Les cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales sont semblables aux cellules souches adultes, elles sont multipotentes. Elles disposent en revanche de l'avantage d'être relativement naïves sur le plan immunologique. Ceci permet de limiter le rejet de greffe lors des traitements.

Elles sont collectées soit à partir de fœtus lors d'interruption volontaire de grossesse, soit à partir de sang de cordon ombilical. Cette dernière ressource permet d'obtenir des cellules souches hématopoïétiques, une alternative en cas d'absence de compatibilité allogénique principalement lors d'hémopathies malignes.

La France est l'un des pays leader dans la greffe allogénique de cellules issues de sang placentaire. Le Réseau Français de Sang Placentaire a permis de mettre en place un système de collecte et de banques de sang placentaire, d'établir les caractéristiques requises pour valider un don (un volume supérieur à 70 mL et une quantité de cellules souches supérieure à 2.10^6) et d'encadrer ce domaine. Cependant cette filière est en cours de développement et des limites sont encore présentes, concernant le protocole de conservation, la quantité de cellules présentes dans les greffons et principalement le caractère éthique face à cette utilisation (Site internet de l'Agence de la Biomédecine ; Site internet de l'INSERM).

I.2.3.4 Les cellules souches induites

Plus récemment, une avancée scientifique a bouleversée le domaine de la thérapie cellulaire, comme en témoigne le prix Nobel de médecine décerné au Pr YAMANAKA en 2012. La reprogrammation de cellules différenciées somatiques en cellules souches pluripotentes, ou « iPSCs » pour Induced Pluripotent Stem cells.

En 2007, l'équipe du Pr YAMANAKA obtient des cellules aux propriétés similaires à celles des cellules souches embryonnaires (pluripotentes et auto-renouvellement), à partir de fibroblastes humains, en introduisant *via* des vecteurs rétroviraux un cocktail de quatre facteurs de transcription réactivant l'expression des gènes associés à la pluripotence. Les

facteurs Oct3/4, Klf4, Sox2 et c-Myc sont les premiers identifiés et les plus utilisés (Takahashi et al. 2007). D'autres combinaisons ont également prouvé leur efficacité, avec l'utilisation de lentivirus et des facteurs Oct3/4, Sox2, Nanog et Lin28.

Dès lors, la communauté scientifique tente d'améliorer ce processus de reprogrammation ; les méthodes de vectorisation, le choix des cellules, le cocktail de facteurs sont autant de variables. Un enjeu particulier repose sur la sécurité d'utilisation des vecteurs. En effet, le caractère intégratif du génome de certains virus compromet leur utilisation en thérapeutique clinique, de plus la réactivation de l'oncogène c-Myc pose le problème de l'induction de tumeurs. Dans l'adaptation de cette technique, le principal objectif demeure d'obtenir une efficacité de reprogrammation maximale dans des conditions de sécurité optimales, sachant que les facteurs nécessaires varient en fonction du type cellulaire et du niveau de maturation de la cellule somatique.

Une fois les cellules iPSCs obtenues, leur caractérisation est indispensable afin de sélectionner les clones de reprogrammation complète. L'identification morphologique, cytogénétique, phénotypique et fonctionnelle peut être validée *in vitro* et *in vivo* (Antony-Debré et al. 2013). Les cellules iPSCs sont mises en culture dans un environnement reproduisant au maximum les conditions physiologiques des niches cellulaires (hypoxie et 37°C). Les milieux utilisés peuvent être complétés par des facteurs de croissance pour réguler la prolifération *via* l'auto-renouvellement.

Concernant l'utilisation des cellules iPSCs, elles permettent, comme les cellules « ES », d'obtenir n'importe quel type cellulaire, sans l'inconvénient du caractère éthique et de leur accessibilité. Leur potentiel tant thérapeutique qu'à des fins de recherche est immense : en recherche fondamentale et appliquée *in vitro* pour des tests toxicologiques, pour des modélisations physiopathologiques, pour le screening de médicaments, et *in vivo* pour la médecine régénérative, la thérapie cellulaire et la thérapie génique (Figure 3).

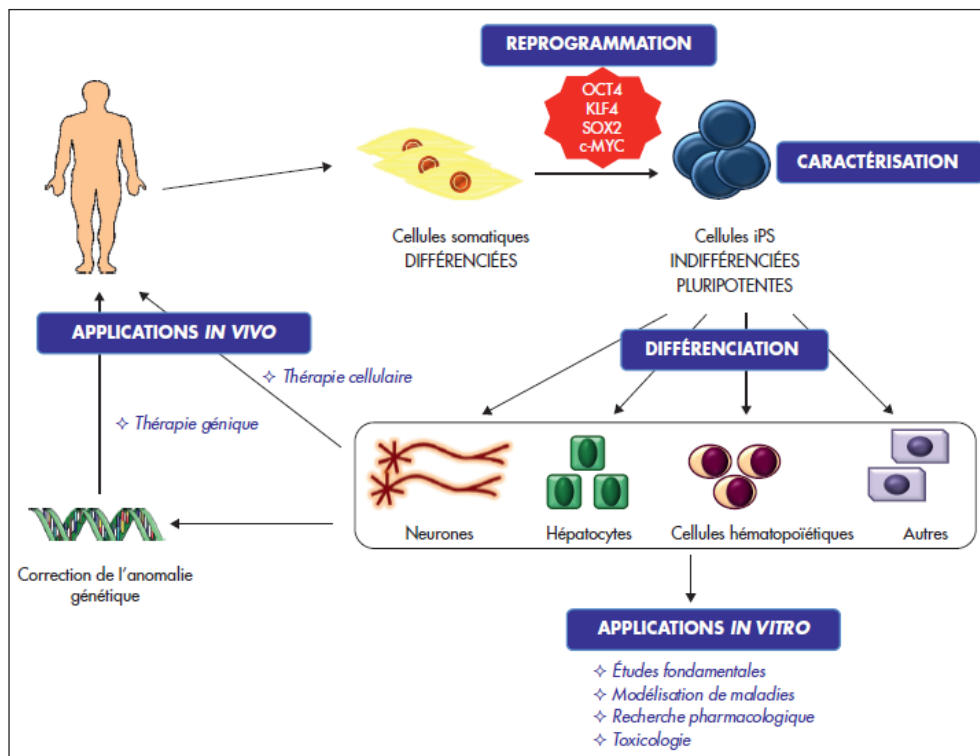


Figure 3: Schéma général concernant les iPSCs – Antony-Debré et al. 2013

Les résultats précliniques sont encourageants mais l'utilisation de telles cellules en clinique humaine est difficile. D'une part les procédures de production cellulaire doivent suivre les normes BPF (GMP) afin que les autorités réglementaires les valident comme cellules thérapeutiques de grade clinique. D'autre part la technique n'est pas suffisamment maîtrisée pour être utilisée avec sécurité. Même si l'intérêt demeure fondamental, les avancées dans ce domaine suggèrent de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses (Antony-Debré et al. 2013).

I.3 Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) possèdent une multipotence qui les rend particulièrement intéressantes en recherche thérapeutique. Aussi leur caractère immunologique a fait grandir l'intérêt de ces cellules comme outils de thérapie cellulaire en médecine régénérative.

I.3.1 Leurs caractéristiques

Initialement isolées à partir de la moelle osseuse en 1976 par l'équipe de FRIEDENSTEIN, les cellules souches ne portaient pas encore ce nom. C'est en 1991 que CAPLAN introduit le terme de « cellules souches mésenchymateuses » remplaçant celui de « cellules dérivées de la moelle osseuse ».

Malgré une caractérisation précise pas si évidente, des profils différents entre les cellules fraîches et celles en culture, des caractéristiques minimales ont été proposées par la Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire (Girard 2012 ; Dominici et al. 2006) :

- l'adhérence aux boîtes de culture en plastique,
- l'expression des marqueurs CD105, CD90, CD73 ; et l'absence des marqueurs CD 45, CD34, CD14, CD79 et HLA-DR, même si ceux-ci peuvent varier en fonction de l'origine tissulaire des cellules.
- la capacité de différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes en fonction des conditions de culture et de milieux spécifiques.

Ces critères sont soumis à des modifications au fur et à mesure de l'avancée des recherches. Par exemple le CD34 est présent sur les CSM issues du tissu adipeux mais pas sur celles issues de la moelle osseuse (Girard 2012). Ils ont pour but de faciliter les échanges de données et d'homogénéiser la communication entre chercheurs.

D'autres caractéristiques ont cependant été identifiées. Le phénotype morphologique identique à celui des fibroblastes ainsi que la capacité de former des colonies *in vitro* appelées « CFU-F » (Colony-Forming Unit-Fibroblasts) ont été décrits dans les travaux initiaux. L'auto-renouvellement, spécifique du caractère « souche » des cellules, l'a été peu de temps après. Ensuite il s'agit d'une population cellulaire hétérogène indifférenciée à l'origine de sous-populations mésodermiques mais aussi des tendinocytes et myocytes. Par l'ajout de facteurs, *in vitro*, les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en autres types cellulaires issus des feuilletts ecto- et endodermiques, c'est la transdifférenciation (Kobolak et al. 2015).

I.3.2 Leurs sources

La première localisation où les cellules souches mésenchymateuses ont été identifiées est la moelle osseuse. Elles y sont présentes en faible quantité, $1/10^5$ des cellules mononuclées. Les cellules souches mésenchymateuses participent à la croissance des progéniteurs hématopoïétiques *via* le relargage de facteurs de croissances et de cytokines hématopoïétiques (IL-7, IL-8, IL-11...) (Jorgensen 2013).

Cependant des études ont montré que la distribution biologique de ces cellules est large, mais leurs caractéristiques morphologiques, immuno-phénotypiques et leur potentiel de croissance sont semblables quel que soit le tissu d'origine. En revanche leur potentiel de différenciation semble être variable. Ces études ont permis d'isoler les cellules souches mésenchymateuses de tissus très variés ; le tissu adipeux est le plus largement étudié, il possède jusqu'à environ 100 fois plus de cellules souches mésenchymateuses que la moelle osseuse (Merceron et al. 2008). Le foie, le muscle, le placenta, le cerveau et même les dents ont révélé la présence de ces cellules. Semblant absentes du sang périphérique, elles ont pu être isolées à partir de vaisseaux sanguins. Cette présence périvasculaire suggère que cet espace constitue une niche, et pourrait expliquer cette large distribution des cellules souches mésenchymateuses (Da Silva Meirelles et al. 2006).

I.3.3 Leurs fonctions

Leurs différentes fonctions dépendent surtout du tissu d'origine et du contexte physiologique environnant (Figure 4). Leur première et principale fonction est d'assurer l'homéostasie tissulaire grâce à la différenciation classique et la transdifférenciation. Cette plasticité est dépendante de l'environnement cellulaire et est ciblée dans certaines stratégies thérapeutiques. Ainsi les cellules sont dans un état quiescent basal, et elles s'activent (prolifération, mobilisation et différenciation) en cas d'atteinte tissulaire. Le contrôle de ses différents états est réalisé par le microenvironnement, ceux sont les niches cellulaires. Ces niches intègrent l'effet des facteurs intrinsèques et extrinsèques ainsi que la communication intercellulaire (Jones et al. 2008). Dans la moelle osseuse, les CSM assurent à la fois le renouvellement tissulaire par différenciation en ostéocytes, mais aussi le soutien actif de l'hématopoïèse *via* la sécrétion de facteurs dans le microenvironnement de la niche où elles sont localisées. Cette fonction de niche cellulaire fait l'objet de recherches, pour identifier les mécanismes mis en jeu, les facteurs sécrétés et le rôle des CSM en fonction de leur origine

embryonnaire (Charbord et al. 2014).

La notion de niches cellulaires fait intervenir la deuxième principale fonction des cellules souches mésenchymateuses, leur action paracrine. Les cytokines, les chimiokines et facteurs de croissance sécrétés ont des actions variées. Une activité pro-angiogénique est exercée *via* le VEGF ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), mais aussi *via* leur localisation dans la zone périvasculaire. Cette propriété est la cible de nombreuses stratégies thérapeutiques dans les maladies ischémiques (cardiaque, rénale, du membre). D'autres facteurs sont impliqués dans l'activité anti-apoptotique et anti-fibrotique que possèdent les cellules souches mésenchymateuses. Aussi leur résistance au stress oxydatif, provenant de la sécrétion de molécules anti-oxydantes puissantes, joue un rôle important dans tous ces processus. Enfin une activité anti-inflammatoire est liée à la sécrétion d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), de prostaglandine E2 ou encore l'interleukine IL-6 (Ruiz et al. 2015).

Les processus de l'inflammation étant étroitement liés à l'immunité, la troisième fonction importante pour la caractérisation est la capacité d'immuno-modulation. Les cellules souches mésenchymateuses régulent la réponse immunitaire en inhibant la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8, lymphocytes B, cellules NK (Natural Killer), en bloquant le cycle cellulaire des cellules présentatrices de l'antigène. Ces effets sont dus à la fois aux facteurs solubles excrétés par les CSM et au contact direct avec les cellules de l'immunité innée et acquise (Jorgensen 2013). Cette propriété de régulation de l'immunité est potentialisée par l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires, par exemple l'interféron- γ stimule la sécrétion d'IDO par les CSM et donc leur pouvoir dans la réaction immunitaire (Meisel et al. 2004). Les propriétés immuno-modulatrices étant variables suivant l'individu, l'espèce, des conditions de culture, des recommandations ont été proposées par la Société Internationale pour la Thérapie cellulaire. Elles concernent les tests permettant d'évaluer le caractère immuno-modulateur des cellules souches mésenchymateuses humaines (Krampera et al. 2013).

Des études plus récentes ont montré qu'en plus des facteurs solubles, les cellules souches mésenchymateuses sécrètent des vésicules extracellulaires appelées exosomes impliquées dans la communication intercellulaire. Ces vésicules seraient de nouveaux médiateurs dans l'immuno-modulation exercée par les CSM (Bruno et al. 2015). Le rôle de ces vésicules extracellulaires est largement étudié dans des modèles précliniques comme pour l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral. Ces exosomes seraient impliqués

dans chacune des fonctions paracrine et aussi de soutien des cellules souches mésenchymateuses. Ces exosomes pourraient être une explication au manque de corrélation entre les améliorations fonctionnelles et les prises de greffes (ou différenciations) au site atteint (Ruiz et al. 2015).

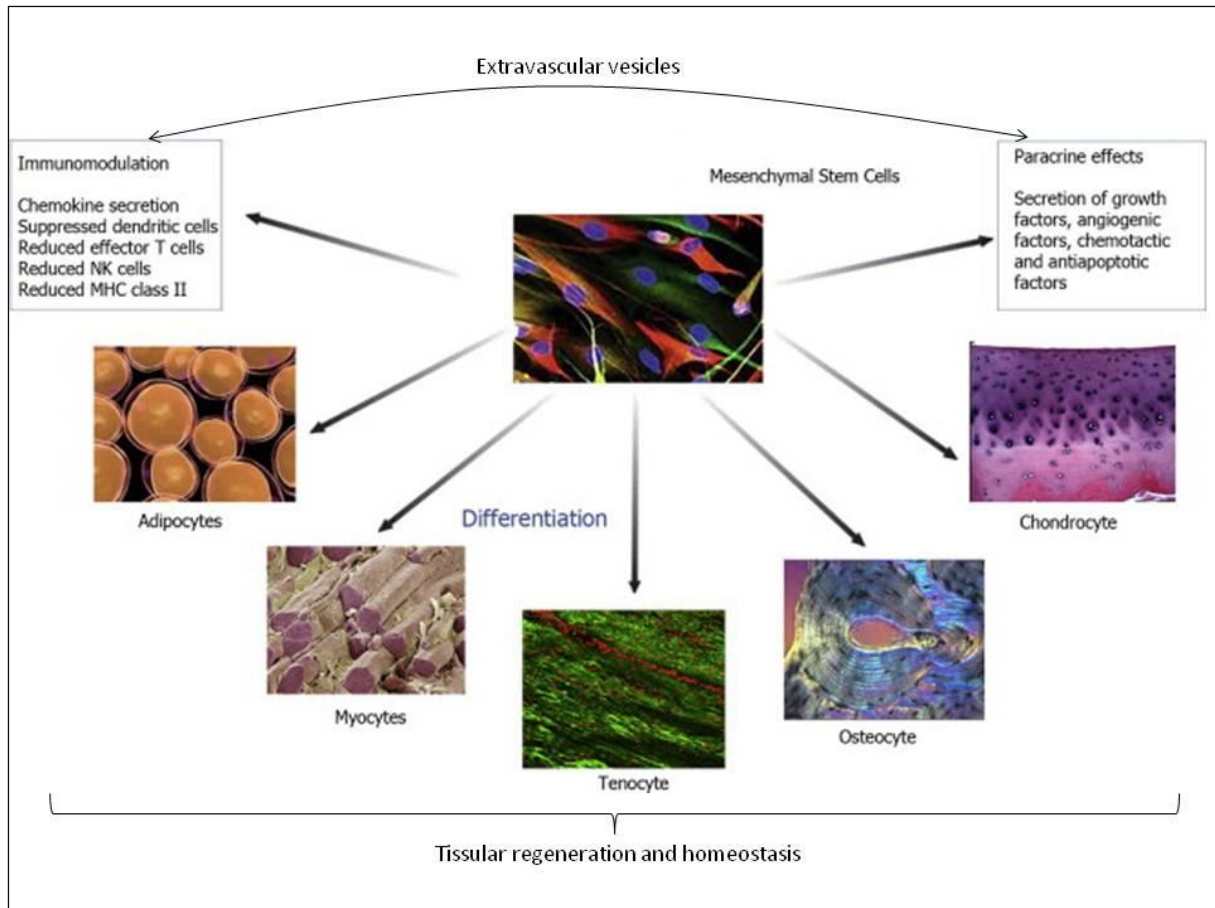


Figure 4 : Fonctions des cellules souches mésenchymateuses : la différenciation et transdifférenciation permettent la régénération tissulaire ; les fonctions immuno-modulatrices et paracrine sont aussi assurées par les vésicules extracellulaires – adapté de Nixon et al. 2012

Les cellules souches mésenchymateuses présentent donc de nombreux avantages pour la thérapeutique humaine par la médecine régénérative. Elles peuvent être facilement accessibles, cultivables et manipulables. Elles possèdent un pouvoir immuno-modulateur qui les rend particulièrement intéressantes pour la greffe allogénique. Leur utilisation est peu concernée par les problèmes éthiques et les essais précliniques ont montré des effets positifs et encourageants. Ainsi certaines applications cliniques sont en cours d'études. Cependant la découverte des iPSCs a provoquée de nouvelles ambitions thérapeutiques.

I.4 Les succès de la thérapie cellulaire

I.4.1 Les thérapies cellulaires approuvées

Les recherches concernant la thérapie cellulaire datent de plusieurs décennies, et déjà certaines stratégies sont autorisées par les autorités de santé.

La greffe d'épiderme autologue pour les Grands Brûlés est une des thérapies cellulaires les plus anciennes. A partir d'une biopsie, les cellules sont cultivées *in vitro*, puis les feuillets d'épiderme sont greffés au patient (Figure 5). Cette stratégie présente de nombreux inconvénients, la fonction du greffon est limitée (immaturité du derme, cicatrices), le coût est élevé et la culture fait intervenir des composés xénogéniques. Une amélioration serait d'utiliser les cellules souches mésenchymateuses, à la fois comme cellules nourricières et aussi comme cellules médicament (en co-culture) pour leur effet anti-inflammatoire principalement.

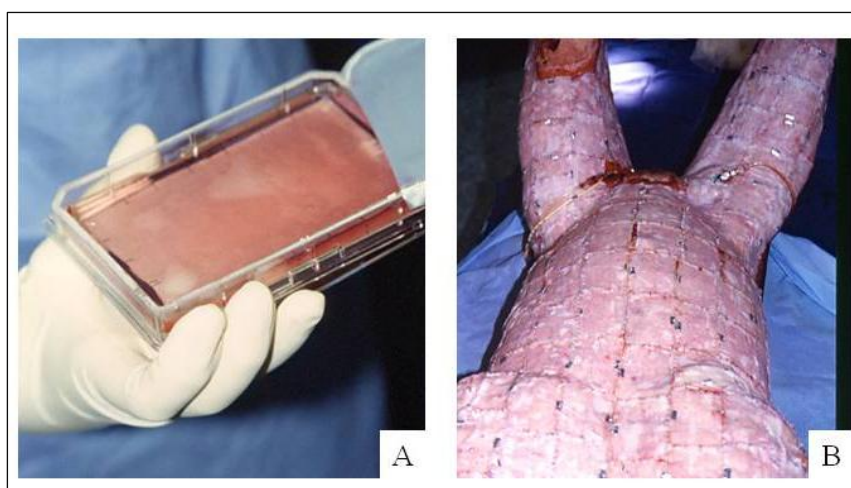


Figure 5: Thérapie cellulaire pour les Grands Brûlés : les feuillets d'épiderme autologue sont produits directement sur des pansements (A) ; greffe des feuillets (B) – source : cours de Biothérapies Master 2 ISM par le Pr J.J. Lataillade 2014.

Le second domaine approuvé pour l'utilisation de la thérapie cellulaire est l'oncologie. La greffe de cellules souches hématopoïétiques dans les hémopathies malignes date des années 1980. Après le protocole de chimiothérapie, la greffe permet de restituer la fonction hématopoïétique et lymphocytaire. La greffe peut être soit autologue soit allogénique. Au Canada, la greffe de cellules souches mésenchymateuses allogéniques est autorisée dans le traitement de la réaction du greffon contre l'hôte chez l'enfant (Site internet de l'INSERM).

En février 2015, le premier médicament de thérapie cellulaire à recevoir une autorisation de mise sur le marché est l'Holoclar[®]. Il est indiqué chez les adultes souffrant d'une brûlure des yeux (destruction de l'épithélium de la cornée). Holoclar[®] consiste en la réimplantation des cellules épithéliales cornéennes autologues obtenues *ex vivo* à partir de cellules souches limbiqes autologues situées en périphérie de la cornée (Site internet de l'EMA).

I.4.2 Les essais cliniques

Le succès de la thérapie cellulaire se traduit par l'augmentation du nombre d'essais cliniques mais aussi par la variabilité des cellules utilisées ainsi que les domaines dans lesquels ils sont réalisés. Ces études cliniques permettent de conforter la montée en puissance de cette stratégie thérapeutique innovante repoussant les limites de certains traitements. Les essais cliniques sont en phase I, voire II, ils évaluent ainsi la sécurité d'utilisation de ces nouvelles thérapies et leur efficacité possible.

I.4.2.1 Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches embryonnaires, comme les iPSCs, offrent de larges perspectives thérapeutiques. Les essais cliniques se concentrent sur le domaine ophtalmologique ; mais ils débutent en cardiologie et dans les maladies métaboliques. Pour les autres domaines (le système nerveux, les poumons, la peau et les cheveux) les études précliniques sont encourageantes et devraient aboutir à des essais cliniques (Kimbrel et al. 2015).

En effet l'œil possède des caractéristiques facilitant les premiers essais chez l'Homme. Cet organe est un environnement isolé qui dispose d'une grande tolérance aux antigènes étrangers ou aux cellules non histocompatibles, ceci permet un maintien optimal pour les cellules transplantées. Ainsi des maladies comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la maladie de Stargardt et la dégénérescence maculaire myopique sont les principales cibles des essais cliniques récents. Huit essais concernent des cellules épithéliales pigmentaires de la rétine dérivées de cellules souches embryonnaires et un premier essai avec ces mêmes cellules mais dérivées de cellules iPSCs. Ce premier essai chez l'Homme utilisant la stratégie iPSCs est mené depuis septembre 2014 au sein de l'institut RIKEN au Japon. Il a cependant été mis en attente car les cellules iPSCs d'un second patient présente des mutations génétiques. Les industries pharmaceutiques s'intéressent et s'investissent dans ce domaine, ainsi Pfizer réalise un essai clinique au Royaume-Uni dans le traitement de la DMLA avec des

cellules dérivées de cellules souches embryonnaires (Kimbrel et al. 2015 ; Site internet de l'INSERM).

La cardiologie a aussi été témoin d'un succès, en octobre 2014 une patiente atteinte d'insuffisance cardiaque sévère a été greffée avec des cellules cardiaques dérivées de cellules souches embryonnaires. Dix semaines après, son état s'est amélioré sans complications apparentes (Site internet de l'INSERM). Le premier essai clinique est en cours de recrutement en France, il vise à tester l'administration de progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires par l'intermédiaire de patchs de fibrine (Kimbrel et al 2015).

Enfin le diabète de type 1 est la cible du premier essai clinique initié en 2014 par une société américaine (ViaCyte). La stratégie est d'envelopper, dans un dispositif semi-perméable, les cellules endothéliales pancréatiques dérivées de cellules souches embryonnaires. Le dispositif protège les cellules des attaques du système immunitaire tout en maintenant le transfert d'oxygène, de nutriments et de l'insuline sécrétée en fonction du taux de glucose sanguin. Cette combinaison de cellules dans ce dispositif médical est injectée en sous-cutanée. Aussi les pathologies digestives intestinales et hépatiques sont ciblées dans cette approche de thérapie cellulaire (Kimbrel et al. 2015).

I.4.2.2 Les cellules souches mésenchymateuses

Des centaines d'essais cliniques sont réalisés en utilisant les cellules souches mésenchymateuses à travers le monde (436 au 1^{er} octobre 2015, selon la recherche « mesenchymal stem cells », en excluant ceux dont le statut est inconnu, sur le site internet www.clinicaltrials.gov) (Figure 6). La quantité démesurée d'études faisant intervenir les cellules souches mésenchymateuses traduit ce fort potentiel thérapeutique et le large éventail de domaines dans lesquels une thérapie cellulaire peut être envisagée. Ainsi la cardiologie avec l'accident vasculaire cérébral, l'ischémie des membres inférieurs ou l'infarctus du myocarde, le rejet de greffe ou les maladies auto-immunes sont autant de cibles testées. Une étude de phase II est en cours à San Diego concernant l'accident vasculaire cérébral ischémique et le potentiel des cellules souches mésenchymateuses de favoriser la prolifération des tissus lésés. Une étude semblable est menée en Corée. Un autre essai de phase II est initié au Canada au sujet de l'action neuroprotectrice des CSM dans la sclérose en plaque (maladie auto-immune) (Site internet de l'INSERM). Une revue des applications cliniques a été réalisée sur les données au 22 octobre 2012. La majorité des essais cliniques sont en phase I

ou II (voire combinée I et II), mais certains ont atteint la phase III (Sharma et al 2014).

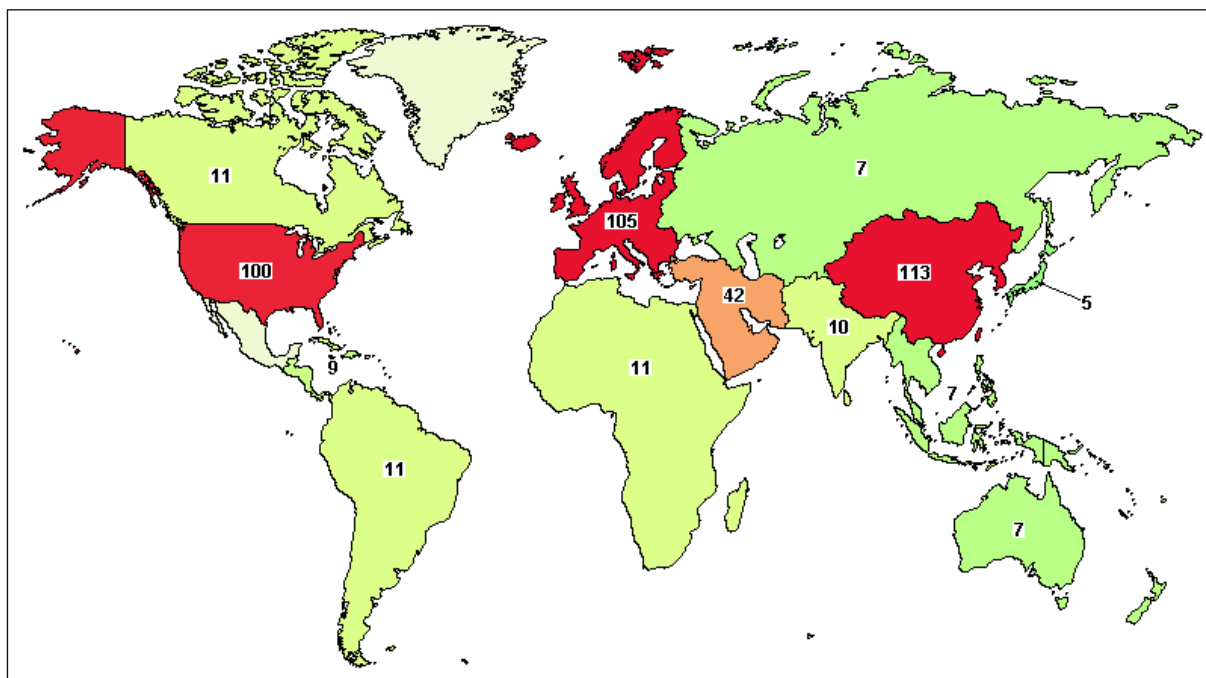


Figure 6 : Essais cliniques concernant les cellules souches mésenchymateuses enregistrés au 1er octobre 2015 : l'échelle de couleur est représentative de la quantité des essais enregistrés (de vert : la plus faible à rouge la plus élevée) – source www.clinicaltrials.gov

En affinant les critères de recherche, 11 études présentent des résultats, ces études ciblent la cardiologie (chirurgie cardiaque, athérosclérose) et le compartiment osseux (atteintes osseuses et arthrose). En modifiant d'autres critères de recherche, 21 études sont enregistrées concernant l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses dans l'arthrose.

Cet intérêt décuplé pour la thérapie cellulaire marque le caractère innovant de cette stratégie thérapeutique, et ainsi des pathologies, comme l'arthrose, se trouvant en impasse thérapeutique s'offrent de nouvelles perspectives de traitement. En effet l'arthrose est une maladie candidate de choix, d'abord par sa physiopathologie (maladie dégénérative et inflammatoire), et ensuite par le manque de stratégies thérapeutiques curatives.

II. L'ARTHROSE

L'arthrose ne constitue pas une maladie univoque, en effet il s'agit plutôt d'un groupe d'affections caractérisées par la dégénérescence articulaire. D'une part, les mécanismes physiopathologiques, bien qu'encore mal élucidés, ainsi que les étiologies sont variés. D'autre part les principaux symptômes cliniques sont la douleur et la perte de fonction de l'articulation, mais ils peuvent varier en fonction de l'articulation atteinte. Ces conditions affectent la qualité de vie des patients atteints avec des incapacités et handicaps. Il s'agit de la principale affection chronique rhumatismale et la prévalence de cette atteinte augmente avec le vieillissement de la population, cependant son incidence évolue aussi dans d'autres classes de population avec des facteurs de risques comme l'obésité. Ainsi les enjeux socio-économiques sont réels. Face à ceci, les traitements proposés sont symptomatiques en première intention, certaines techniques chirurgicales peuvent cependant être utilisées, mais cela aboutit, la majorité du temps, au remplacement de l'articulation par une prothèse. Malgré les nombreux efforts depuis des années, les approches visant de nouvelles stratégies ont montré des résultats limités (Aigner et al. 2006).

II.1. L'articulation

Les principales fonctions d'une articulation sont d'assurer la posture et le mouvement sans douleur ni raideur ou friction. Ainsi l'articulation se compose de deux parties osseuses recouvertes par du cartilage articulaire. Elle est entourée par la capsule articulaire dont la face interne est recouverte par la membrane synoviale ; différents autres types de tissus de connexion entrent aussi dans sa composition comme l'os sous-chondral et les ligaments (Figure 7) (Clouet et al. 2009 ; Aigner et al 2006).

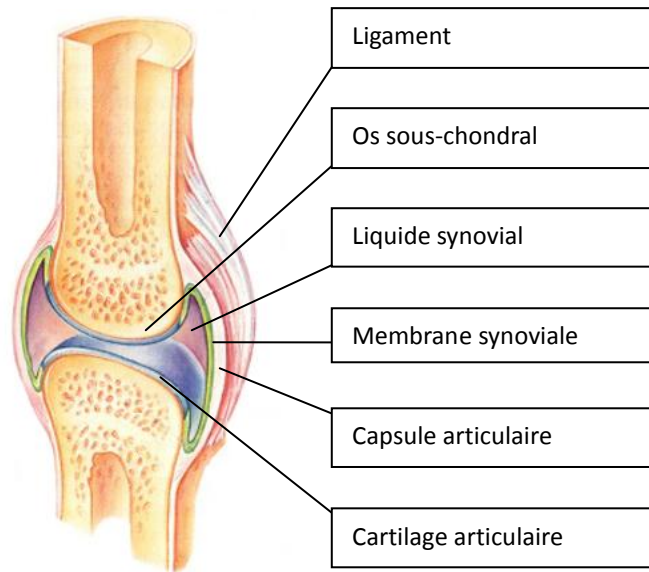


Figure 7 : Schéma d'une articulation – adapté de www.mclef.net/pageweb/d_articulation.htm

II.1.1 Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire, cartilage hyalin, est un tissu lisse, à surface régulière, non vascularisé, non innervé, composé d'une matrice extracellulaire. Son épaisseur varie de 2 à 5 mm en fonction des articulations, il est généralement plus épais chez l'homme que chez la femme. Les chondrocytes, qui sont le seul type cellulaire présent, assurent le métabolisme, la synthèse et la dégradation de cette matrice. Dans le cartilage normal adulte, les chondrocytes se divisent peu. Leur métabolisme énergétique s'effectue en anaérobiose, donc relativement lentement et avec un faible renouvellement de ses composants synthétisés (ce renouvellement est stimulé lors de la sollicitation mécanique de l'articulation).

Les composants de la matrice extracellulaire sont principalement (Figure 8) :

- l'eau, qui représente de 70% à 85% du poids humide du tissu, y existe sous la forme libre, ou liée aux protéoglycanes
- les fibres de collagène de type II (le plus abondant et spécifique), mais aussi des fibres de collagènes dit mineurs (de type I, III, IX, XI), formant un réseau, ayant une demi-vie de l'ordre de centaines d'années,
- les protéoglycanes à fort pouvoir hydrophile : les aggrécans sont des macromolécules composées de liaisons covalentes entre des protéines axiales et des glycosaminoglycanes. Ces aggrécans sont liés à l'acide hyaluronique par des protéines

de liaison, ils forment des agrégats capturant les grandes quantités d'eau intercellulaire. Ils ont une demi-vie de l'ordre de quelques mois.

On retrouve dans le cartilage articulaire d'autres glycoprotéines non collagéniques ayant un rôle dans la cohésion et la régulation fonctionnelle des chondrocytes (mécanorécepteurs).

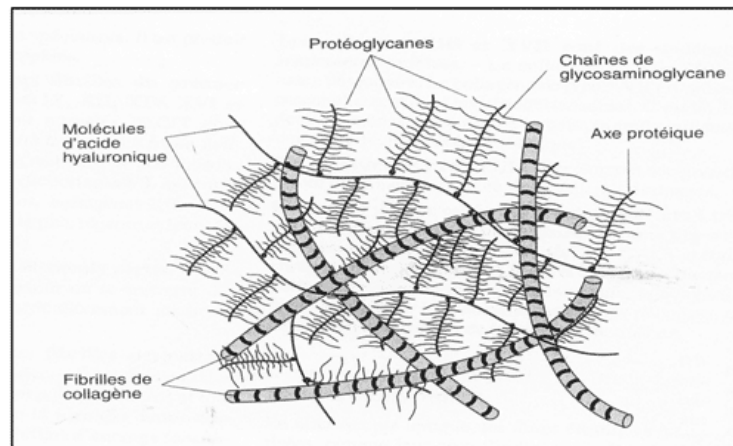


Figure 8: Composition de la Matrice Extracellulaire - archives.coordination-nationale-infirmiere.org

La teneur de ces composants et leur organisation varient, d'une articulation à l'autre, et en fonction de la profondeur dans le cartilage. Le nombre, la forme et la distribution des chondrocytes sont différents dans chacune des quatre couches identifiées (Figure 9). Celles-ci sont :

- La région la plus superficielle (proche du liquide synovial, zone 1) : les fibres de collagène sont orientées de façon parallèle à la surface de l'articulation, les chondrocytes sont nombreux, ellipsoïdaux, et les protéoglycanes sont en faible quantité.
- La région transitionnelle (zone 2): les fibres de collagène sont orientées de façon oblique dans un réseau peu organisé (en amas), concentré autour des chondrocytes plus gros de forme ronde, groupés et le taux de protéoglycanes augmente.
- La région profonde (zone 3): les fibres de collagène sont orientées perpendiculairement avec l'articulation, le long desquelles les chondrocytes, redevenus plus petits, forment des colonnes caractéristiques. Cette région est séparée de la suivante par un front de calcification (« tide-mark » en anglais)
- La région calcifiée (zone 4), la plus profonde et directement en contact avec l'os sous-chondral, les fibres de collagène se calcifient, épaisses et imprégnées de cristaux

d'hydroxyapatite, permettent l'ancrage du cartilage, les chondrocytes sont hypertrophiés et en nombre limité.

Les fonctions du cartilage résident dans ses propriétés biomécaniques. C'est-à-dire plutôt dans les caractéristiques d'élasticité, *via* les agrégats d'aggrécanes et les mouvements d'eau, et les caractéristiques de viscosité, *via* le réseau de collagène, de la matrice extracellulaire que par les chondrocytes eux-mêmes. Ce sont alors des fonctions dans l'amortissement et la répartition des pressions exercées pour le côté statique, ainsi que le bon mouvement des parties osseuses entre elles en diminuant les frottements pour le côté dynamique. Ces fonctions contribuent à la protection de l'os sous-chondral (Mitrovic et al. 2010 ; Clouet et al. 2009 ; Berenbaum 2008 ; Aigner et al. 2006 ; Richette 2005).

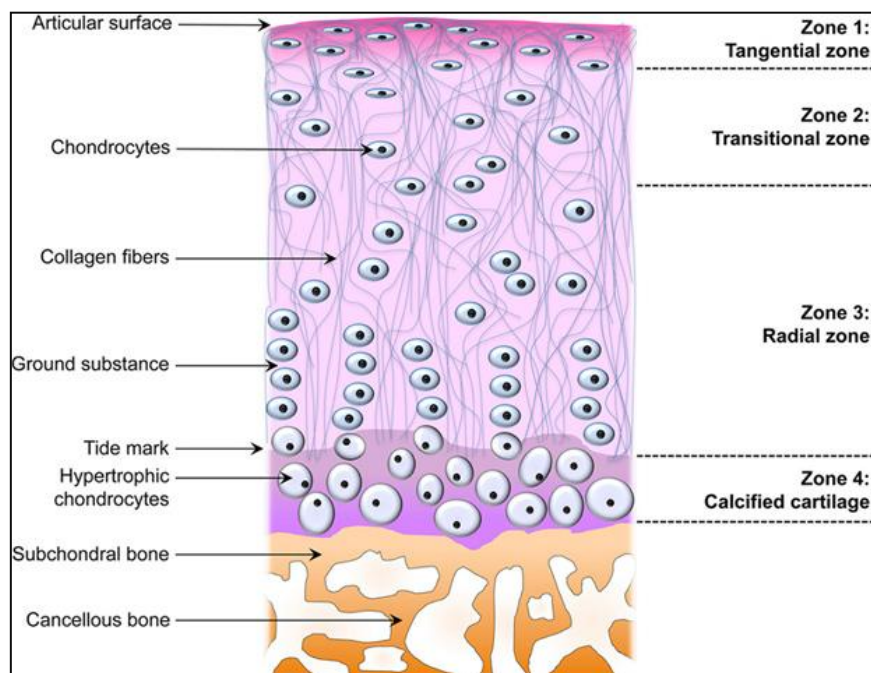


Figure 9: Structure histologique du cartilage articulaire - www.naturalheightgrowth.com

II.1.2 La capsule articulaire et synoviale

La capsule articulaire est la structure fibreuse et élastique autour de l'articulation. Avec les ligaments, elle contribue à la stabilité et détermine la flexibilité du mouvement.

La face interne est constituée par la membrane synoviale et ses synoviocytes, qui jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie articulaire. Le liquide synovial sécrété par les synoviocytes permet la diffusion des nutriments, substances et molécules telles que l'oxygène vers les chondrocytes. Les synoviocytes assurent une fonction d'évacuation des

métabolites et produits de dégradation. Enfin ils produisent l'acide hyaluronique permettant la protection du cartilage articulaire et la lubrification des articulations (Aigner et al. 2006).

Toutes ces interactions se résument dans la citation de J. ARLET en 1971 : « La membrane synoviale sécrète le liquide synovial, le liquide synovial nourrit le cartilage, le cartilage protège l'os, les ligaments orientent le mouvement, les muscles produisent le mouvement, le mouvement est nécessaire à la vie de l'articulation ». Ceci explique aussi la complexité de la maladie qu'est l'arthrose.

II.2 Les atteintes de l'articulation dans l'arthrose

L'arthrose est une maladie dégénérative ostéo-articulaire, plus complexe qu'un simple processus de sénescence du cartilage articulaire. Elle résulterait d'une réponse mal adaptée entre les stress mécaniques et autres facteurs appliqués sur l'articulation et l'activité chondrocytaire résultante. Les atteintes sont retrouvées au niveau de chacune des structures de l'articulation, quelles soient histologiques, cellulaires et moléculaires. Au niveau morphologique, l'espace articulaire se réduit et, à terme, les deux régions osseuses de l'articulation sont en contact. Ainsi le terme anglo-saxon « osteoarthritis » résume la physiopathologie, avec « osteo-» pour le compartiment osseux, « arthr-» pour la composante articulaire (les chondrocytes et synoviocytes) et le suffixe « itis » correspondant à une composante inflammatoire (Berenbaum 2008) (Figure 10).

II.2.1 Le cartilage

Les lésions arthrosiques du cartilage sont la résultante de phénomènes mécaniques et biologiques. Les altérations macroscopiques du cartilage se manifestent par la couleur plus jaune et une érosion de la surface qui devient irrégulière, fibrille, se fissure et peut aller jusqu'à la perte de fragments de cartilage et le dévoilement de l'os sous-chondral, stade ultime de la physiopathologie. Ces fragments se retrouvent dans le liquide synovial et aboutissent à des calcifications.

La destruction de la matrice cartilagineuse est due à un déséquilibre entre la dégradation et la synthèse *de novo* des composants de cette matrice. Les modifications sont alors à la fois quantitatives, en faveur du catabolisme chondrocytaire (dédifférenciation) et partiellement de l'apoptose cellulaire, mais aussi qualitatives, avec une déshydratation, la

déstructuration du réseau de collagène et la synthèse anormale de collagène de type I et III ainsi que des protéoglycanes plus petits remplaçant les aggrécans. Ces modifications vont aboutir à un amincissement du cartilage jusqu'à sa disparition.

Lors du catabolisme accru, certains facteurs et médiateurs sont surexprimés. Ceci est dû à un emballement des communications autocrines et paracrines des chondrocytes. Avec une stimulation des voies de signalisation aboutissant à l'augmentation de transcription et traduction des gènes impliqués. C'est le cas pour certaines métalloprotéases matricielles (MMP), principalement MMP-1, 3, 13, solubles et sécrétées dans le milieu extracellulaire, actives au pH physiologique sur des sites de clivage d'aggrécans et de collagènes. C'est aussi le cas des prostaglandines, synthétisées *via* la cyclo-oxygénase (COX-1 à l'état physiologique et COX-2 à l'état pathologique) qui peuvent stimuler ou inhiber la synthèse et la dégradation des protéoglycanes et du collagène. Ou encore des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF α (qui sont les plus étudiées) inhibent la synthèse des composants matriciels par stimulation de la production d'enzymes cataboliques (Mitrovic et al. 2010 ; Berenbaum 2008 ; Aigner et al. 2006).

II.2.2 L'os sous-chondral

Les premières atteintes sont des densifications de l'os sous-chondral principalement au niveau des zones où le cartilage est atteint. Il s'en suit une sclérose ainsi qu'une nécrose associée. Ce sont des caractéristiques communes d'une dégénérescence avancée de l'articulation atteinte et elles seraient une cause de la douleur articulaire symptomatique liée à l'arthrose (il existerait une corrélation entre la douleur ressentie et la condensation osseuse).

De plus ces atteintes peuvent impliquer que le liquide synovial se retrouve en contact avec les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse. Il en résulterait une néoformation osseuse aboutissant à la formation d'ostéophytes et qui peut être considérée comme une réponse physiologique endogène, ainsi que la formation de nodules de cartilage (Clouet et al. 2009 ; Berenbaum 2008 ; Aigner et al. 2006).

II.2.3 La capsule articulaire

En plus de la douleur, un autre symptôme est caractéristique de la dégénérescence articulaire : la raideur de l'articulation. Elle peut s'expliquer par une fibrose de la capsule articulaire, apparaissant dans des stades avancés de la pathologie. L'événement précurseur

étant une présence anormalement élevée de déchets du cartilage lié au turn-over de la matrice extracellulaire, il entraîne une activation et une prolifération des synoviocytes et donc une hyperplasie de la membrane synoviale afin d'augmenter la clairance des déchets moléculaires.

Ces réactions aboutissent à une inflammation de la membrane synoviale ou synovite, pouvant montrer une infiltration lymphocytaire étendue, une sécrétion de protéases et cytokines pro-inflammatoires (IL1- β et TNF α) impliquées dans le catabolisme du cartilage (Berenbaum 2009 ; Aigner et al. 2006).



Figure 10: Les atteintes articulaires de l'arthrose – HAS, focus du 18 mars 2014 – Pascal Marseaud

II.3 Les différents types d'arthrose

Selon la localisation et l'étiologie plusieurs types d'arthroses sont identifiés, regroupés soit dans la catégorie des arthroses primitives, c'est-à-dire n'ayant pas de facteur causal évident mais plutôt une prédisposition à un cartilage anormal, soit dans la catégorie des arthroses secondaires, donc liées à des contraintes anormales.

La coxarthrose, la gonarthrose, l'arthrose digitale, l'arthrose de l'épaule (omarthrose), l'arthrose du coude et du poignet et l'arthrose de la cheville, sont les principales pathologies, sachant que les trois premières sont le plus souvent primitives alors que les trois dernières le sont exceptionnellement. Cependant plusieurs facteurs peuvent être associés et leur degré de responsabilité complexe à déterminer (Richette 2005). Pour la suite du travail, l'accent sera mis sur la gonarthrose.

II.4 Épidémiologie

L'épidémiologie descriptive, visant à établir un état des lieux concernant un problème de santé des populations, repose sur l'incidence, c'est-à-dire le nombre de nouveaux cas sur une période donnée, ainsi que sur la prévalence, c'est-à-dire le nombre de personnes atteintes à un instant/moment donné. Ces deux paramètres varient en fonction des paramètres cliniques ou radiologiques choisis.

De plus la survenue étant complexe et multifactorielle (mécanique, biologique, génétique), et ceci n'étant admis que depuis peu de temps, les études épidémiologiques sont en cours de développement au sujet de l'arthrose (Glyn-Jones et al. 2015 ; Site internet de la Société Française de Rhumatologie SFR).

II.4.1 Santé publique

Sa prévalence est estimée à environ 17% avec un nombre de personnes en souffrant évalué entre 9 et 10 millions, selon la Société Française de Rhumatologie. Elle serait la deuxième cause d'invalidité en France. L'incidence annuelle serait (pour l'arthrose du genou) 240/100 000 personnes années (Le Pen et al. 2005 ; Site internet de la SFR). Selon d'autres sources, l'arthrose serait la plus commune des pathologies des articulations, dont la prévalence est de 10% des hommes et 18% des femmes de plus de 60 ans qui seraient atteints (Glyn-Jones et al. 2015).

La prévalence (selon les critères radiographiques) varie en fonction des articulations, de 70% pour les lombaires et cervicales, de 40% pour les genoux, 30% pour la main et 10% pour les hanches et les chevilles. L'arthrose du genou symptomatique touche 6,6% des femmes et 4,7% des hommes.

La seule caractéristique fiable étant la corrélation de cette pathologie avec l'âge et le vieillissement de la population tendent à penser que le nombre de personnes atteintes ne va qu'augmenter. Ceci en fait donc un problème de santé public à part entière, sans compter qu'il s'agit de la deuxième cause d'invalidité.

II.4.2 Facteurs de risques

L'identification de ces facteurs de risques permettrait de décrire certains phénotypes et ainsi de proposer des solutions thérapeutiques plus appropriées. Les facteurs de risques sont de deux types : fonctionnels, c'est-à-dire des propriétés physiques d'un individu et donc plutôt extrinsèques, et systémiques, regroupant les caractéristiques intrinsèques à un individu.

Ainsi, les facteurs fonctionnels regroupent toutes les actions biomécaniques hostiles, quelles soient liées à des anomalies morphologiques (dysplasie de la hanche, anomalies osseuses du fémur ou du tibia, anomalies d'alignement des membres inférieurs avec le varus et le valgus, différence de longueur entre les deux jambes), ou bien liées à des blessures (atteintes des ligaments ou des ménisques).

Quant aux facteurs systémiques, l'âge est le facteur de risque principal (bien que la maladie pouvant se déclarer avant 40 ans, elle atteint au moins 50% des plus de 65 ans). L'obésité constitue le deuxième facteur de risque le plus important. En effet le surpoids implique des charges et donc des pressions plus élevées sur l'articulation, ce qui va activer les mécanorécepteurs et donc les voies de signalisation des métalloprotéases. Cependant, l'arthrose atteint aussi les articulations « non-porteuses », ce qui laisse penser que des protéines inflammatoires comme les adipokines, en quantité plus importante chez les sujets obèses, seraient impliquées.

Aussi le sexe semble être discriminant, les femmes sont plus atteintes que les hommes, le rôle des œstrogènes est encore mal élucidé.

Enfin, la composante génétique est connue et déjà 11 loci sont associés à l'arthrose. Le polymorphisme des gènes codant pour le collagène de type IX, l'IGF-1 et le récepteur à la vitamine D seraient corrélés avec un risque augmenté d'arthrose. Bien qu'encore incapable d'identifier avec fiabilité les patients atteints, la génomique devrait permettre de révéler de nouveaux marqueurs biologiques (Glyn-Jones et al. 2015 ; Site internet de la SFR ; Clouet et al. 2009 ; Berenbaum 2008).

II.4.3 Pharmaco-économie

La pharmaco-économie se veut être l'étude de la relation entre des indicateurs de santé et une estimation des coûts correspondants pour une pathologie donnée. Ces coûts sont mesurés par une approche macroéconomique et sont différenciés en coûts directs et coûts indirects. Afin que les chiffres observés soient comparables entre les différentes années, ils doivent être ajustés par les variations de prix, *via* un index d'inflation comme le déflateur du Produit Intérieur Brut (PIB).

Cependant plusieurs problèmes de comparabilité des études sont mis en avant. Le principal reste les frais inclus dans chaque catégorie de coûts, mais aussi les études peuvent n'évaluer qu'un seul des deux types de coûts. Ainsi les coûts estimés peuvent être partiels, s'ils n'incluent pas les pertes de productivité au travail (dues à des absences, ou des arrêts définitifs), les coûts liés aux soins formels (par des personnes aidantes) ou informels (aide de la famille). Les coûts directs peuvent regrouper les visites chez un généraliste, un spécialiste, les examens de diagnostic (radiographie), les médicaments, les hospitalisations, mais cette liste n'est pas exhaustive et chaque étude est différente. De plus d'autres caractéristiques doivent être prises en compte comme celles de la population (âge, activité, type d'arthrose, diagnostic), celles de la méthode utilisée (mesure des coûts, approche épidémiologique, approche prospective). Un autre problème de comparabilité des études est celui d'incrémentation des groupes témoins, qui sont soit pris dans un échantillon de population quelconque, soit construits à partir d'une population sans arthrose. Ce manque d'uniformité ne permet pas d'évaluer et de comparer efficacement les études entre différents pays et même certaines études pour le même pays.

Malgré cela, les coûts directs annuels par patient en 2011 seraient d'en moyenne 4 175€, et d'en moyenne 4 774€ pour les coûts indirects, concernant l'arthrose du genou (Puig-Junoy et al. 2014).

Une étude relate du coût financier de l'arthrose en France, l'étude COART, elle se base sur des estimations de 1993 et 2002, dans une perspective selon le point de vue de l'assurance maladie. Les coûts prennent en compte les soins de ville, les hospitalisations ainsi que les arrêts de travail, pour des pathologies d'arthroses périphérique et rachidienne. Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

	Résultats de l'étude Levy <i>et al.</i> [11] en 1993	Résultats de l'étude COART France en 2003	Évolution en %
Population			
arthrosique symptomatique	3 millions	4,6 millions	+ 53
Consultations			
Nombre	8,7 millions	13,4 millions	+ 54
Coût	145 millions €	270 millions €	
Traitements			
Nombre de prescriptions	14 millions	18 millions	+ 28
Coût	150 millions €	574 millions €	
Hospitalisations			
Nombre	93 000	127 000	+ 37
Coût	270 millions €	820 millions €	
Coût annuel par patient			
Hospitalisé	3425 €	5800 €	
Non hospitalisé	98 €	181 €	
Coûts directs	641 millions €	1644 millions €	

Tableau 1 : Evolution du coût socioéconomique de l'arthrose (1993-2003) - Etude COART (Le Pen et al. 2005)

Le constat est le suivant, la population atteinte d'arthrose symptomatique a augmenté, entraînant avec elle une augmentation des consultations et donc des prescriptions, mais aussi une modification de la prise en charge tant médicale qu'économique.

Concernant les dépenses de médicaments, elles ont été multipliées par quatre, l'arrivée de nouveaux traitements, plus chers et substitués au long court aux traitements précurseurs en est l'explication principale. Les dépenses d'hospitalisation représentent 1,2% des dépenses hospitalières de l'assurance maladie. L'augmentation de près de 40% est due à une augmentation du recours aux arthroplasties de la hanche et du genou. Ce qui traduit des stades très avancés de la maladie, ou des impasses thérapeutiques. La recherche concernant de nouvelles prises en charge est donc primordiale car les hospitalisations concernent peu de patients mais leur poids économique est très important, près de la moitié des coûts. L'étude a estimé un coût moyen annuel 30 fois supérieur pour un patient hospitalisé. De plus la perte de productivité est importante, plus de cinq millions de journées d'arrêts de travail ont été délivrées, et ceci est estimé à environ 180 millions d'euros.

Les coûts directs représentent plus de 1,6 milliards d'euros, soit 1,7% des dépenses de santé, avec une progression de 2,5% par an et par patient, avec le vieillissement notable de la population ainsi que la progression de facteurs de risques, l'impact pharmaco-économique de cette pathologie devient un challenge important (Le Pen et al. 2005).

II.5 Diagnostic

Les principaux outils de diagnostic de l'arthrose sont, d'une part, l'interrogatoire du patient, qui en général fait suite à des plaintes de ce dernier et l'amène à consulter son médecin, et d'autre part l'examen d'imagerie médicale qui en apporte la confirmation.

Cependant il peut exister une dissociation entre les symptômes cliniques et l'imagerie, c'est-à-dire qu'une arthrose minime radiologiquement peut s'avérer douloureuse, et inversement, un caractère indolore d'une atteinte importante du cartilage.

Dans un cas comme dans l'autre, le diagnostic précoce de cette pathologie est un véritable challenge. Cette stratégie amène à rechercher d'éventuels marqueurs biologiques, voire même à l'indentification de phénotypes, afin de pouvoir mettre en œuvre des traitements efficaces le plus tôt possible.

II.5.1 Diagnostic Clinique

Le premier symptôme et le plus important est la douleur. Elle est localisée à la région atteinte, face antérieure du genou, ou plus diffuse, et elle se manifeste par poussées. L'évaluation de la douleur se fait grâce à une échelle visuelle analogique (EVA), ceci permet une mesure simple entre 0 « pas de douleur » et 10 « douleur maximale envisagée », et ceci permet aussi, chez un même patient de suivre l'évolution de la maladie et l'efficacité des traitements.

Le second symptôme discriminant est la raideur ou la gêne articulaire, allant jusqu'à des déformations articulaires dans les stades les plus tardifs. L'association de ces deux principaux symptômes est mesurée par les index algo-fonctionnels de Lequesne spécifique à la hanche et au genou.

Ces symptômes sont d'apparition progressive et de type mécanique, c'est-à-dire liés à une activité physique (descente d'escalier, agenouillement, marche...) et disparaissent avec le repos. Puis cette douleur et cette raideur peuvent prendre un caractère plus chronique, avec une intermittence de périodes indolores, enfin elles apparaissent suite à une période de repos (station assise prolongée, au levé, raideur des articulations) alors la maladie se trouve déjà à un stade avancé. De plus ces symptômes peuvent varier en fonction du temps, des pathologies chroniques associées et des voies de modulation de la douleur (Glyn-Jones et al. 2015 ;

Richette 2005).

Lors de ce diagnostic clinique d'autres éléments doivent être identifiés comme : la présence d'une boiterie lors de la marche, un problème d'alignement des membres, avec le genu varum (« jambes arquées ») ou le genu valgum (« genou en X ») qui entraînent des arthroses secondaires internes et externes respectivement, des amplitudes ou des mouvements anormaux (signes de laxité ligamentaire) ou encore la présence de chaleur et d'épanchement articulaire par la palpation, qui indiquera alors une composante inflammatoire.

II.5.2 Imagerie Médicale

Il existe plusieurs types d'examen, premièrement, la radiographie classique est le type le plus simple, mais aussi le plus ancien donc le mieux maîtrisé et documenté. C'est la technique de référence. Elle s'effectue sur les deux articulations symétriques (pour un éventuel contrôle si une seule est atteinte) et selon différents modalités (rayon incident postérieur, de face, de profil, en charge, avec 30° de flexion...). Les caractéristiques révélées par cet examen sont :

- une diminution de la largeur de l'espace articulaire (ou pincement articulaire)
- la formation d'ostéophytes sur les bords de l'articulation
- la sclérose et la formation de géodes (nécrose cicatricielle) de l'os sous-chondral

Ces critères peuvent être employés dans des systèmes de scoring, permettant une classification en différents stades lors du diagnostic et du suivi, comme par exemple le système de Kellgren Lawrence. Cette classification définit cinq stades, 0 « aucun signe », 1 « ostéophyte de signification douteuse », 2 « ostéophyte net mais sans modification espace articulaire », 3 « ostéophyte net et diminution espace articulaire » et 4 « pincement de l'interligne articulaire et sclérose de l'os sous-chondral ». La figure 11 ci-après illustre le stade 0 (Figure 11A), le stade 3 (Figure 11B) et le stade 4 (Figure 11C).

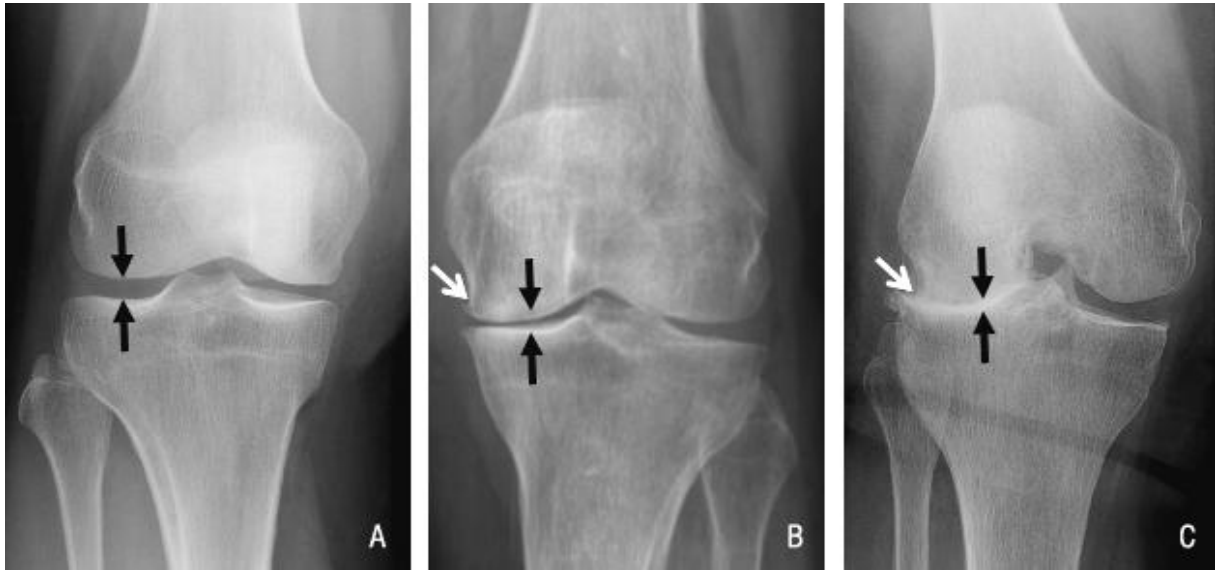


Figure 11 : Examens radiologiques de genoux de face ; Stade normal ou 0 (A), Stade modéré ou 3 (B) ; Stade avancé ou 4 (C) ; les flèches noires symbolisent l'espace articulaire et les flèches blanches localisent des ostéophytes. - www.ims77.com

Il faut tout de même garder à l'esprit la dissociation clinique et radiologique qui existe dans cette pathologie. De plus une standardisation dans l'acquisition d'images est nécessaire pour ne pas influencer les mesures. Cette technique permet de bien visualiser les calcifications des tissus mous, cependant l'analyse des tissus mous eux-mêmes tels que les ligaments ou la membrane synoviale est limitée. Cette limite amène à compléter le diagnostic par de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

Deuxièmement, l'IRM permet une exploration morphologique ainsi qu'une évaluation des articulations en trois dimensions, avec une haute résolution, ce qui induit une détection plus sensible des changements structuraux avec des mesures associées. Une exploration fonctionnelle peut être pratiquée en utilisant des produits de contraste. L'utilisation de l'imagerie par IRM est maintenant recommandée par l'OARSI (OsteoArthritis Research Society International). Bien que la technique conventionnelle fournisse un contraste suffisant pour visualiser la morphologie et donc la dégradation du cartilage, des améliorations et de nouvelles stratégies peuvent être utilisées pour évaluer la composition biochimique du cartilage et ses changements précoces (Glyn-Jones et al. 2015 ; Matzat et al. 2014).

Enfin d'autres techniques, comme l'échographie, pour l'analyse de la membrane synoviale et la tomodensitométrie (computed tomography CT) pour l'analyse des parties

osseuses, peuvent être employées mais elles le sont peu en clinique. Les techniques d'imagerie émergent de façon importante dans les études de dégénération du cartilage et les tests de nouvelles thérapies, mais elles ont besoin d'être plus sensibles pour être utilisées à plus grande échelle (Matzat et al. 2014).

Concernant les marqueurs biologiques, les molécules effectrices comme les composants de la matrice extracellulaire ont le potentiel d'être des biomarqueurs. Leur concentration est liée au métabolisme tissulaire et peut être mesurée dans le sang, les urines ou le liquide synovial. Beaucoup de marqueurs ont été proposés mais aucun n'a été suffisamment validé pour un usage clinique. Par exemple, le CTX-II (C-terminal telopeptide of collagen type II) a une concentration supérieure dans l'urine de patients atteints d'arthrose que dans les personnes saines, mais la sensibilité et la spécificité sont faibles et sont plus mauvaises que les mesures par imagerie. Avec l'émergence de la protéomique, les études au sujet de ces marqueurs biologiques augmentent. Les résultats devraient être améliorés si ces marqueurs sont combinés aux techniques d'imagerie et même aux analyses de génotypage (Glyn-Jones et al. 2015).

II.6 Traitements

II.6.1 Recommandations de prise en charge

Plusieurs institutions proposent des recommandations de prise en charge de l'arthrose, elles sont établies *via* des consensus d'experts, une analyse de la littérature ainsi qu'une médecine fondée sur les preuves. Les trois principales structures sont le groupe international OARSI, The European League Against Rheumatism (EULAR) et la Haute Autorité de Santé (HAS).

Tout d'abord la prise en charge doit être personnalisée, c'est le principe de base ; chaque individu étant différent tant sur un plan biologique (caractéristiques de la pathologie, facteurs de risques ...) que sur un plan socioprofessionnel (activités, connaissances sur la maladie, coûts des traitements proposés...) les solutions proposées doivent être adaptées (Fernandes et al. 2013 ; Berenbaum 2008).

Ensuite les objectifs de ce traitement sont multiples et parmi-eux :

- réduire la douleur et la raideur des articulations,
- maintenir et améliorer la mobilité des articulations,
- limiter la progression de la maladie,
- éduquer les patients sur la maladie et sa prise en charge.

La première recommandation est celle de l'association de stratégies non pharmacologiques et de traitements pharmacologiques pour une prise en charge optimale. Ces stratégies englobent les mesures hygiéno-diététiques ; visant à améliorer son alimentation, réduire le poids et pratiquer plus régulièrement une activité physique ; mais aussi la kinésithérapie (renforcement musculaire, aquagym et cures thermales...) et aussi le port d'orthèses ou de cannes, et même des séances d'acupuncture. L'accès à l'information est primordial pour que le patient comprenne l'importance du bon suivi de son traitement et de ses changements de style de vie. Ces stratégies non pharmacologiques sont donc le traitement de première intention.

Les autres recommandations concernent les traitements pharmacologiques et leur utilisation (en fonction de la phase aiguë ou chronique de la maladie). Le paracétamol (ou acétaminophène) est considéré comme le traitement initial, en cas d'inefficacité les Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) seront utilisés mais seulement à court terme. Les traitements locaux (AINS topiques, injections intra-articulaires corticostéroïdes, viscosupplémentation ...) sont des alternatives possibles aux traitements systémiques. Les antiarthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL) ont une place controversée dans la stratégie thérapeutique. Enfin les opioïdes ne doivent être prescrits qu'en cas de douleur réfractaire sévère.

Le dernier recours thérapeutique dans cette pathologie est la chirurgie avec le remplacement de l'articulation par une prothèse. Les arthroplasties de remplacement sont indiquées en cas d'arthrose réfractaire à tout traitement. C'est le seul traitement curatif disponible à ce jour (HAS 2014 ; Fernandes et al. 2013 ; Zhang et al.2008).

II.6.2 Traitements pharmacologiques

II.6.2.1 Le paracétamol

Le paracétamol (ou acétaminophène) présente des propriétés analgésiques et antipyrétiques, mais pas anti-inflammatoires. Il est indiqué dans le traitement des douleurs légères à modérées. D'un point de vue pharmacocinétique, l'absorption digestive et la distribution sont rapides et complètes, le métabolisme est hépatique et l'élimination urinaire, sa demi-vie est de 2 à 3 heures (Vital Durand et al. 2013).

Dans l'arthrose, le paracétamol est l'analgésique par voie orale de premier choix, jusqu'à 4g/24h. Il peut être pris en traitement aigu en cas de crises de douleur mécanique. Son efficacité et sa tolérance permettent aussi une indication à long terme, cependant il existe des effets indésirables liés à son hépatotoxicité (Clouet et al. 2009).

Que ce soit son mécanisme d'action ou son métabolisme, le paracétamol est encore étudié largement. Des modèles mathématiques sont même mis en place pour palier les imperfections des modèles *in vivo* (différents cytochromes hépatiques en fonctions des espèces) et permettre de déterminer tous les événements liés au métabolisme et à la toxicité (Reddyhoff et al. 2015). Malgré une large utilisation mondiale, l'efficacité du paracétamol dans l'arthrose est soumise à de nombreuses controverses, bien que disposant d'une meilleure tolérance digestive que les AINS, les risques gastro-intestinaux ainsi que les risques cardiovasculaires se rapprocheraient de ceux induits par ces derniers (Richette et al. 2015).

II.6.2.2 Les AINS

Les AINS typiques, non sélectifs, inhibent la synthèse de prostaglandines, ce qui leur confère un effet antalgique et antipyrétique à faible dose, ainsi qu'un effet anti-inflammatoire à dose plus élevée. Les Coxibs sont des AINS sélectifs de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). L'absorption digestive est rapide, le métabolisme hépatique et l'élimination urinaire (Vital Durand et al. 2013).

Dans l'arthrose, les AINS sont prescrits en cas d'inefficacité du paracétamol, aux doses les plus faibles efficaces et uniquement lors de poussées douloureuses. Il n'y a pas de meilleure efficacité lors d'un usage à long terme (Richette et al. 2015). Les Coxibs possèdent une indication spécifique dans l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde.

Qu'ils soient sélectifs ou non, ces AINS doivent être associés à des protecteurs gastriques comme des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) et au misoprostol (antisécrétoire et cytoprotecteur de la muqueuse gastroduodénale). Leur cardio-toxicité est largement documentée. Ainsi de nombreuses précautions d'emploi concernent ces molécules et sont à adapter en fonction des facteurs de risques de chaque patient (Zhang et al. 2008). L'utilisation sous forme topique permet de réduire ces effets systémiques indésirables, et se révèle être soit une alternative à la voie orale soit un complément permettant de diminuer les administrations.

II.6.2.3 Autres

Toujours dans une stratégie de traitement symptomatique de la douleur, les injections intra-articulaires de corticoïdes ont une recommandation limitée avec un intervalle de 3 ou 4 mois, principalement réservées en cas d'épanchement. Les formes microcristallines sont préférées aux solutions hydrosolubles pour leur action prolongée. Ces injections de corticoïdes permettent d'obtenir un effet anti-inflammatoire en s'affranchissant au maximum des effets systémiques (Vital Durand et al. 2013 ; Clouet et al. 2009).

Les opioïdes sont considérés comme le dernier recours dans le management de la douleur et sont destinés à des patients totalement réfractaires aux autres traitements pharmacologiques. Leur utilisation doit être exceptionnelle en raison des nombreux effets indésirables (gastro-intestinaux, altération de la fonction cognitive, dépendance et dépression respiratoire...) et une arthroplastie doit être envisagée. (Zhang et al. 2008).

L'injection intra-articulaire d'acide hyaluronique constitue une autre approche, la viscosupplémentation. En effet l'acide hyaluronique est un composant de la MEC du cartilage, son injection permettrait de pallier aux déficiences de production des synoviocytes lors d'arthrose (Losfelt, 2013). Son action est retardée (2 à 5 semaines après l'injection) mais prolongée (jusqu'à 12 mois) avec une diminution significative des symptômes dont la douleur, une amélioration fonctionnelle mais l'amélioration structurale n'a pas été démontrée (Glyn-Jones et al. 2015 ; Clouet et al. 2009 ; Zhang et al. 2008).

Il existe d'autres molécules mais qui cette fois servent à ralentir la dégradation du cartilage, ceux sont les antiarthrosiques symptomatiques d'action lente AASAL. Au regard de leur efficacité trop faible, l'HAS a estimé que de nombreux AASAL « n'avaient pas leur place dans la stratégie thérapeutique de l'arthrose de la hanche et du genou » (HAS 2014). Les

molécules appartenant à cette famille sont la glucosamine, la diacérhine, la chondroïtine, les insaponifiables d'avocat et de soja. Elles disposent d'Autorisation de mise sur le marché limitée au traitement symptomatique à effet différé de l'arthrose du genou (Losfelt, 2013). La glucosamine et la chondroïtine n'ont pas d'intérêt à être poursuivies au-delà de 6 mois, si aucune amélioration n'est observée (Zhang et al. 2008).

Enfin les thérapies alternatives, comme l'homéopathie, la phytothérapie ou encore l'aromathérapie, s'orientent vers le traitement préventif et curatif de la douleur, mais les stratégies thérapeutiques ne sont pas spécifiques à l'arthrose elle-même.

II.6.3 Traitements chirurgicaux

L'approche chirurgicale représente l'ultime recours en cas d'inefficacité des traitements pharmacologiques associés aux mesures non-pharmacologiques.

Dans certains cas particuliers, particulièrement celui de la dysplasie, la progression de l'arthrose peut être ralentie grâce au réalignement du membre inférieur, ou ostéotomie. Ce réalignement va diminuer les charges sur les parties arthrosiques, mais cela ne va pas les traiter. Le but est donc de stopper la progression d'une arthrose secondaire. L'issue clinique de cette opération dépend de l'angle qui doit être corrigé. L'ostéotomie est recommandée chez le jeune adulte, il s'agit de préserver l'articulation au maximum. (Glyn-Jones et al. 2015 ; Losfelt 2013 ; Clouet et al. 2009).

Le remplacement, partiel ou total, d'une articulation atteinte d'arthrose est devenu une opération de routine, destinée aux cas les plus récalcitrants. Le remplacement peut être unilatéral ou bilatéral. Cette opération est optimisée pour être la moins invasive possible, elle est réalisable sur toutes les articulations, principalement les hanches et genoux, mais aussi les épaules. Ces arthroplasties permettent de restaurer la fonction de l'articulation et donc améliorent la qualité de vie des patients. Si l'arthroplastie aboutit à une infection du site, une arthrodèse peut être envisagée. Il s'agit de l'induction artificielle d'une ossification entre les os d'une articulation. (Clouet et al. 2009 ; Zhang et al. 2008).

D'autres stratégies visent à réparer, de façon localisée, les lésions cartilagineuses. La mosaïcplastie est une technique qui consiste à greffer une pièce de cartilage sain et d'os sous-chondral (allo/auto greffe) à partir d'une zone saine, sur la zone atteinte. Les limites de cette stratégie sont techniques, d'une part cette méthode chirurgicale est particulière, et d'autre part

la ressource (le cartilage sain) peut être faible. Une autre stratégie est la microfracture. Elle consiste à stimuler la régénération du cartilage en perforant l'os sous-chondral. Les précurseurs chondrogéniques seront relargués *via* le saignement. Ces cellules vont se différencier mais vont aboutir à du fibrocartilage plutôt que du cartilage hyalin. Cette technique est plus simple à réaliser et plus largement utilisée en médecine régénérative (Glyn-Jones et al. 2015).

II.6.4 Nouvelles approches : les Biothérapies

La réparation du cartilage ne peut pas être optimale si l'environnement reste mécaniquement ou biologiquement hostile. Mise à part l'arthroplastie, il n'y a dans ces différentes stratégies (non-pharmacologique, pharmacologique ou chirurgicale) que des traitements symptomatiques. L'arthrose se trouve donc dans une impasse thérapeutique. Compte tenu du contexte démographique (vieillesse de la population, augmentation de l'obésité..), la recherche d'une solution thérapeutique curative ou préventive fait l'objet de nombreux travaux.

Le développement de nouveaux analgésiques ou anti-inflammatoires est en cours avec par exemple le test de nouveaux inhibiteurs de cyclo-oxygénases et de lipooxygénases simultanément. Des molécules de faibles poids moléculaires inhiberaient sélectivement l'activité catabolique des MMP. Un antagoniste recombinant du récepteur à l'IL-1 est indiqué dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde. Les anti-TNF α ° (adalimumab : anticorps monoclonaux bloquant le processus de l'inflammation) sont à l'étude (Glyn-Jones et al. 2015 ; Loseff 2013 ; Clouet et al. 2009).

Les derniers développements incluent l'utilisation d'autres sources de cellules *via* le domaine de la thérapie cellulaire (chondrocytes, cellules souches mésenchymateuses et embryonnaires), l'utilisation de facteurs de croissance, de l'ingénierie tissulaire pour maintenir les cellules dans une conformation tridimensionnelle favorable (Glyn-Jones et al. 2015). L'utilisation de la thérapie cellulaire permet d'envisager plusieurs stratégies, la première serait d'obtenir des chondrocytes afin de compléter les zones déficientes de façon à régénérer du cartilage hyalin. La seconde stratégie, et celle qui semble se confirmer, serait d'utiliser le potentiel anti-inflammatoire des cellules souches mésenchymateuses. Cette thérapie cellulaire fait l'objet de nombreuses études, en l'associant à l'ingénierie tissulaire.

Enfin une dernière voie nécessite plus d'études tant *in vitro* qu'*in vivo*, il s'agit de la thérapie génique, qui viserait à stimuler l'expression des gènes impliqués dans le processus de régénération (Clouet et al. 2009).

II.7 Stratégies de thérapie cellulaire dans le modèle de l'arthrose.

La médecine régénératrice est au cœur des recherches actuelles, et les Biothérapies offrent des moyens aussi divers que variés pour les réaliser. La stratégie de la thérapie cellulaire dans la maladie de l'arthrose permet d'envisager des réponses non fournies par les traitements pharmacologiques dans le domaine de la prévention et de la progression de la maladie. L'association à l'ingénierie tissulaire permet de restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions du tissu en développant des substituts biologiques.

II.7.1 Différents projets de recherche en cours

Le principal projet de recherche concernant la thérapie cellulaire dans l'arthrose est un projet européen de recherche collaborative, le projet ADIPOA, coordonné par le Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier. Ce projet vise à valider l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses adipeuses comme traitement de l'arthrose par stimulation de la régénéscence, en injection intra-articulaire. Les études de première administration chez l'Homme ont prouvé l'innocuité de l'injection et même une amélioration du score de la douleur ainsi qu'une amélioration fonctionnelle. Le projet ADIPOA-2 a pour perspective de mener un essai clinique de phase IIb, à grande échelle, débuté en janvier 2015. Il testera l'innocuité et l'efficacité de l'injection de cellules souches adipeuses mise en culture préalablement, de façon autologue et en association avec de l'acide hyaluronique.

Le projet ROAD « Research on OsteoArthritis Disease », soutenu par la fondation Arthritis pendant 3 ans, a pour objectifs de caractériser des marqueurs biologiques dans des modèles murins, de déterminer des phénotypes des différents stades chez les patients arthrosiques mais aussi dans les modèles animaux, et de développer des stratégies thérapeutiques innovantes, valider les modèles de co-cultures chondrocytes /CSM *in vitro* et *in vivo*.

Un nombre important de sujets de recherche concernent l'arthrose. Dans le domaine *in vitro*, l'optimisation de la culture des cellules au grade GMP (Good Manufacturing Practices)

assure une plus grande sécurité d'utilisation et permet de transposer le traitement à une plus grande échelle, par exemple. Dans le domaine *in vivo*, la caractérisation clinique *via* les modèles animaux améliore les cibles thérapeutiques envisagées, et aussi leur meilleure évaluation. Différentes modalités d'injection et de transplantation, associées ou non à des structures tridimensionnelles, avec d'autres techniques comme la microfracture, sont testées chez les plus grands animaux comme les chèvres, cochons ou encore le cheval (Bornes et al. 2014). Ces études servent de support et orientent les stratégies thérapeutiques testées chez l'Homme.

Des essais cliniques sont réalisés, aux Etats-Unis, concernant l'injection intra-articulaire d'une solution de cellules régénératives à partir de tissu adipeux (NCT02326961), ou encore en Espagne (NCT02365142) l'injection de cellules souches mésenchymateuses autologues de moelle osseuse associées au Plasma Riche en Plaquettes (PRP).

Malgré le grand nombre d'études, il n'y a toujours pas de consensus établi concernant les protocoles ou les techniques permettant de régénérer avec succès le cartilage hyalin. Des précisions sur les issues à long terme des injections de CSM devraient clarifier la place de ces stratégies thérapeutiques comme standard (Bornes et al. 2014).

II.7.2 Choix des cellules

Deux types de cellules peuvent être étudiés : les chondrocytes de diverses origines (articulaire, nasal...) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (extraites de la moelle osseuse, tissu adipeux, muscle, peau, sang de cordon...).

L'implantation de chondrocytes autologues est une technique largement employée. Les chondrocytes prélevés sont amplifiés en monocouche, sur une matrice, par culture cellulaire puis réimplantés aux zones atteintes. Les principales contraintes d'utilisation des chondrocytes sont leur instabilité phénotypique en culture qui les entraîne vers une morphologie fibroblastique. Ceci modifie la production de collagène de type I au détriment du type II, ce qui diminue les propriétés biomécaniques originales. Leur faible disponibilité pour le prélèvement, ainsi que le caractère invasif, sont aussi des facteurs limitants. Des études chez le lapin ont montré que le cartilage nasal semblait être la meilleure origine, mais cela reste à vérifier chez l'Homme (Clouet et al. 2009, Merceron et al. 2008).

Les CSM adultes constituent la source alternative pour la stratégie thérapeutique envisagée. Au-delà des propriétés classiques d'auto-renouvellement et de multipotence ; assurant leur différenciation en chondrocytes notamment, les CSM possèdent d'autres effets tels que l'immunomodulation sur les cellules dendritiques et/ou des cellules T et B, et la sécrétion paracrine de différents facteurs de croissance et cytokines. Ces cellules sont des candidates prometteuses pour l'ingénierie tissulaire associée, cependant des études sont nécessaires au sujet de leurs limites liées à la tumorigénicité, viabilité et reproductibilité des résultats (Jorgensen et al. 2013 ; Merceron et al. 2008). Le tissu adipeux représente une source importante de cellules souches mésenchymateuses, facilement accessible et de manière peu invasive par lipoaspiration. Cependant leur potentiel chondrogénique n'est probablement pas aussi efficace que celui des cellules extraites de la moelle osseuse. Ces cellules, alors appelées cellule souches adipeuses (ASC, « Adipose stem cells »), représentent jusqu'à 5% de la fraction stromale vasculaire (FSV) de ce tissu, ce qui est 100 fois plus que les CSM dans la moelle osseuse (Merceron et al. 2008).

Ces ASC sont largement étudiées, tant en préclinique qu'en clinique. Elles présentent de bons résultats concernant la formation et la régénération du cartilage, principalement lorsqu'elles sont prédifférenciées et associées à une matrice 3D. Une revue bibliographique établi un état de l'art concernant cette stratégie. Le type de milieu d'expansion ainsi que les facteurs chondrogéniques sont les mêmes utilisés dans la majorité des études. La quantité de cellules à injecter pour des résultats optimums est de 1.10^6 à 1.10^7 cellules et le site de prélèvement n'influence pas le potentiel des cellules. Malgré ces résultats, de nombreux points doivent être confirmés, améliorés et uniformisés avant une éventuelle pratique clinique (Veronesi et al. 2014).

Une étude propose de ne pas choisir entre ces deux types cellulaires et étudie donc la combinaison de chondrocytes avec des cellules souches adipeuses. Cette étude révèle *in vitro* et *in vivo* le rôle bénéfique et protecteur d'une co-culture après un stress oxydatif puis de sa transplantation dans un modèle animal, avec des différences significatives concernant les protéoglycanes, la viabilité cellulaire, les expressions de gènes impliqués dans la dégradation du cartilage (Ahmed et al. 2014).

II.7.3 Ingénierie tissulaire associée

Dans le cas de l'arthrose, l'ingénierie tissulaire doit fournir un support qui soit un matériel injectable et biodégradable avec un caractère chirurgical invasif le plus faible possible, idéalement une injection intra-articulaire transcutanée.

Deux approches peuvent être envisagées, la première consiste à générer un tissu fonctionnel *in vitro* puis à l'implanter dans l'articulation ; la seconde suggère de faire une culture très brève *in vitro* et d'implanter une construction immature qui se servirait de l'environnement articulaire *in vivo* pour devenir mature (Clouet et al. 2009).

Une association de ces cellules (chondrocytes ou CSM) avec une matrice adaptée et les facteurs de croissance nécessaires permet de fournir la structure tridimensionnelle et l'environnement favorable pour que les cellules activent leur potentiel de régénération du cartilage. La matrice doit être un biomatériau biocompatible, mais doit aussi remplir certains critères d'homologie au tissu ciblé, tels qu'un degré d'hydratation important ou encore la viscoélasticité pour le cartilage articulaire. Elle doit permettre l'adhésion, la division et la différenciation cellulaire, être perméable aux nutriments ou encore avoir des caractéristiques particulières de solidification. Plusieurs matrices sont disponibles. Elles sont réparties en 3 catégories, celles à base de protéines, celles à base de polysaccharides et les polymères artificiels, et sont classées selon leur forme physique (massives, poreuses, visqueuses, hydrogels...). Compte-tenu de tous ces pré-requis, les hydrogels permettant leur réticulation en fonction de paramètres tels que le pH ou la température sont les candidats les plus prometteurs. (Clouet et al. 2009 ; Merceron et al. 2008).

L'arthrose est une pathologie idéale pour associer la thérapie cellulaire à l'ingénierie tissulaire. En effet les besoins liés à cette pathologie sont à la fois de régénérer les cellules produisant la MEC, et d'assurer la reprise fonctionnelle du tissu. De nombreuses stratégies peuvent ainsi être élaborées, en combinant les bio-polymères aux différentes sources de cellules. La course à la meilleure combinaison est lancée. Les critères d'évaluation sont primordiaux et déterminent les stratégies utilisées. Les critères sont soit cliniques, le traitement testé s'inscrit dans une démarche curative ou préventive en fonction de l'effet pharmacologique (anti-inflammatoire), soit histologiques, le cartilage obtenu se rapproche le plus possible d'une structure hyaline. D'autres critères entrent en compte, la répétabilité et reproductibilité de la technique, le caractère invasif, l'exportation à l'échelle humaine (conditions réglementaires et éthiques), faisabilité au niveau industriel...

III.PARTIE EXPERIMENTALE : ETUDE DE L'INJECTION DE LA FRACTION STROMALE VASCULAIRE EXTRAITE DE TISSU ADIPEUX DANS UN MODELE D'ARTHROSE CHEZ LE RAT

Introduction

La sixième année de Pharmacie, option Industrie, nous permet d'obtenir une double compétence. Le Master 2 Biothérapies, Technologie, Réglementation et Sécurité de l'Université de Grenoble se termine par un stage professionnalisant, d'une durée de six mois, durant lequel j'ai participé à une étude préclinique *in vivo* au sein de la start-up STEM CIS.

STEM CIS, « Stem Cells Innovating System », créée depuis 2008, est spécialisée dans la recherche fondamentale et appliquée concernant le tissu adipeux (TA). Sa stratégie est de développer et commercialiser des dispositifs médicaux (DM) proposant des solutions thérapeutiques innovantes ; mais aussi mettre au point les protocoles associés à l'utilisation de ses DM à usage unique sous la forme de kits. Cette société possède deux filiales. D'une part, Adip'Sculpt s'intéresse aux thérapies tissulaires dans le cadre de chirurgies esthétiques ou reconstructrices, et commercialise des DM pour la greffe autologue de tissu adipeux. D'autre part, Scivet, pour le domaine vétérinaire, développe et commercialise, depuis mars 2015 en France et en Australie, des kits pour le traitement des tendinopathies et de l'arthrose chez le chien et le cheval (Tenopure® et Arthrokill®). Les données recueillies suite à l'utilisation des vétérinaires testant ces DM sont positives, la récupération clinique des chiens et chevaux est notable. Cependant aucune analyse histologique ou par imagerie n'a été faite pour attester des résultats.

Dans l'ambition d'atteindre le marché Humain, avec ces mêmes DM à usage unique, STEM CIS mène un projet de Recherche et Développement (R&D) concernant le traitement de l'arthrose *via* le tissu adipeux. Leurs premières études précliniques *in vivo* testent l'effet de l'injection intra-articulaire de cellules extraites de TA humain (fraction stromale vasculaire (FSV)) dans un modèle d'arthrose chez le rat. Une de ces études ainsi que les premiers résultats seront présentés dans cette partie.

III.1 Description de l'étude

Des études internes *in vitro* ont montré le potentiel des cellules souches adipeuses à synthétiser certains composants des tendons et articulations. Suite à cela, une étude pilote *in vivo* a vérifié l'impact de ces cellules, dans différentes conditions expérimentales, sur des articulations atteintes d'arthrose. La validation et l'optimisation de certaines solutions thérapeutiques potentielles dans la réparation ou la prévention de la détérioration du cartilage

doivent être faites sur un plus grand nombre d'animaux. Cette étude entre dans le cadre d'un projet FEDER, le projet « TACS » pour Traitement de l'Arthrose par thérapie cellulaire. L'objectif de cette étude est double :

Apporter des données objectives sur l'efficacité de la technologie pour développer de nouveaux dispositifs médicaux destinés au traitement des pathologies arthrosiques.

Apporter des données précliniques afin d'étayer le montage d'une étude clinique chez l'Homme.

Le but ultime étant de développer un dispositif médical à usage unique permettant de réaliser toutes les étapes en une seule intervention, le prélèvement de TA, l'extraction et l'injection des cellules de la FSV dans une indication de traitement de l'arthrose.

III.1.1 Design de l'étude

L'étude est réalisée sur un modèle chirurgical d'arthrose optimisé chez le rat. Ce modèle repose sur la section du ligament croisé antérieur des deux articulations fémoro-tibiales des animaux. L'étude consiste en une administration intra-articulaire, dans chacun des 2 genoux du rat, de cellules de la FSV extraites de tissu adipeux humain, donc il s'agit d'une xénogreffe. Cette administration est réalisée sept jours après l'induction du modèle d'arthrose. Les cellules sont injectées selon différentes conditions expérimentales afin d'évaluer la stratégie la plus pertinente à développer chez l'Homme.

Trois mois après la chirurgie d'induction du modèle, les rats sont sacrifiés et leurs pattes sont analysées, dans un premier temps par imagerie (tomographie ex vivo) puis dans un second temps en histologie. Ces deux types d'analyses sont soldés par un scoring qui permet d'objectiver les différences entre les conditions. Ce design de l'étude est repris dans la figure 12 ci-dessous.



Figure 12 : Schéma récapitulatif de l'étude

III.1.2 Conditions expérimentales testées

Les cellules de la FSV sont extraites du tissu adipeux de trois patientes différentes. Chaque prélèvement (et donc extraction cellulaire) est attribué à un lot d'animaux. 13 conditions seront testées et injectées, chacune dans une patte. Au minimum 5 pattes par conditions sont prévues dans chaque lot.

Uniquement quatre conditions, sur les 13 testées, ont été retenues afin de présenter les résultats préliminaires. Il s'agit du Contrôle Ringer Lactate, des cellules seules, du bio-polymère A seul et de l'association de cellules et bio-polymère A.

Les 13 conditions testées dans cette étude sont les suivantes, par mesure de confidentialité certaines seront nommées par des lettres :

- 1) Contrôle Non Injecté (NI), mais piqué avec l'aiguille
- 2) Contrôle Ringer Lactate (RL) (véhicule)
- 3) Cellules de FSV seules
- 4) Cellules de FSV à une concentration 3 fois supérieure
- 5) Cellules extraites selon le protocole P
- 6) Bio-polymère A
- 7) Cellules de FSV combinées au bio-polymère A
- 8) Bio-polymère B
- 9) Cellules de FSV combinées au bio-polymère B
- 10) Immunosuppression 1 mois, Contrôle NI ou RL
- 11) Immunosuppression 1 mois, Cellules de FSV seules
- 12) Immunosuppression 7 jours, Contrôle NI ou RL
- 13) Immunosuppression 7 jours, Cellules de FSV seules

Les deux pattes postérieures de chaque animal sont injectées. La répartition des conditions et des animaux est aléatoire. Certaines précisions doivent être apportées :

- chaque condition ne dispose pas systématiquement de son contrôle négatif sur le même animal,
- une même condition n'est pas présente deux fois sur le même animal. En effet, si l'animal décède cela éviterait de perdre trop de données, ce qui rendrait l'analyse statistiquement non fiable,

- sur le même rat, une patte recevra le bio-polymère seul, et l'autre patte l'association du bio-polymère avec les cellules de la FSV,
- en fonction du protocole d'immunosuppression, le même rat recevra d'un côté le contrôle et de l'autre les cellules.

Concernant la stratégie de bio-ingénierie tissulaire, il a été montré que l'association de cellules et de bio-polymère est favorable au maintien de la survie des cellules et ainsi de leur activité. Ces structures tridimensionnelles offrent aux cellules les conditions propices pour leur survie et la sécrétion de cytokines, effecteurs de l'action thérapeutique anti-inflammatoire.

Concernant la stratégie d'immunosuppression, l'injection étant hétérologue, son utilité dans la tolérance des cellules greffées, qui ne seraient pas prises en charge par le système immunitaire doit être vérifiée, de meilleurs résultats devraient alors être notés pour ces conditions.

III.2 Matériel & Méthodes

III.2.1 Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar Han (*Rattus norvegicus*) fournis par les Laboratoires Janvier. Les animaux sont exclusivement des femelles, non consanguines, et sont répartis en deux lots de 33 animaux (lot 1 et 2) et un lot de 34 animaux (lot 3), soit au total 100 animaux, correspondant aux trois sources de cellules FSV issues de trois patients donneurs de tissu adipeux. Les animaux sont âgés de 13 à 14 semaines ; en effet le modèle est optimisé pour des rats ayant atteint leur maturité. Un âge trop avancé induirait un biais lié au vieillissement normal et rendrait les résultats ininterprétables. En début d'expérience les animaux pèsent en moyenne $260 \pm 11,8\text{g}$.

Toutes les modalités d'expérimentation animale sont consignées dans un formulaire, qui a été évalué et accepté par le comité d'éthique en expérimentation animale au CYROI (C2EA 114). Ce même formulaire est envoyé au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Les aspects développés ci-après sont en accord avec la directive européenne 2010/60/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. L'élaboration de l'étude a été faite dans le cadre éthique du respect de la Règle des 3R : Réduction, Raffinement, Remplacement (éditée par William Russell et Rex Burch).

Premièrement, concernant le principe de réduction, les deux pattes arrière des animaux seront utilisées. Cela permet de diminuer le nombre d'animaux, et cela évite aussi un biais lié à l'éventuelle compensation sur une patte saine.

Deuxièmement, au sujet du raffinement des conditions d'hébergement et de soins, les rats sont hébergés dans l'animalerie de la plateforme CYROI, en respectant les conditions optimales recommandées dans le Journal Officiel n°37 du 13 février 2001, un taux de ventilation entre 15 et 20 renouvellement d'air par heure ; une hygrométrie d'environ 55% ; une température entre 20 et 24°C (pour les rats). Un fond sonore musical ainsi qu'une alternance de périodes de lumière et d'obscurité (12h/12h) sont appliqués. Les animaux immunodéprimés sont isolés dans la zone SOPF (Specific Opportunist Pathogen Free) de l'animalerie prévue à cet effet afin de limiter le risque d'infection. Leurs cages, litière, nourriture et eau sont stérilisés à l'autoclave.

Enfin, le raffinement des conditions d'utilisation, toutes les interventions réalisées dans cette étude ont un degré de sévérité de classe modérée (niveau 2). En effet les animaux retrouvent rapidement une totale mobilité après le réveil. De plus ces interventions sont toutes réalisées sous anesthésie générale, et une administration d'antalgique leur fait suite. La technique de sacrifice est la dislocation cervicale sous anesthésie générale.

L'identification des animaux est faite par l'intermédiaire d'une puce électronique (Datamars®), leur attribuant un numéro. Cette puce est placée en sous-cutanée sur le flanc gauche. Cette insertion est réalisée sous anesthésie générale par isoflurane à 3%, au moment de l'acte chirurgical afin de ne pas répéter les expositions à l'anesthésique.

III.2.2 Modèle expérimental de l'arthrose

Le modèle expérimental de l'arthrose est celui de la section chirurgicale du ligament croisé antérieur (LCA) (Figure 13). Ce modèle est utilisé chez les rongeurs pour étudier les traitements de pathologies ostéo-articulaires et l'équipe de R&D de Stemcis a réalisé des études pilotes afin de l'optimiser.

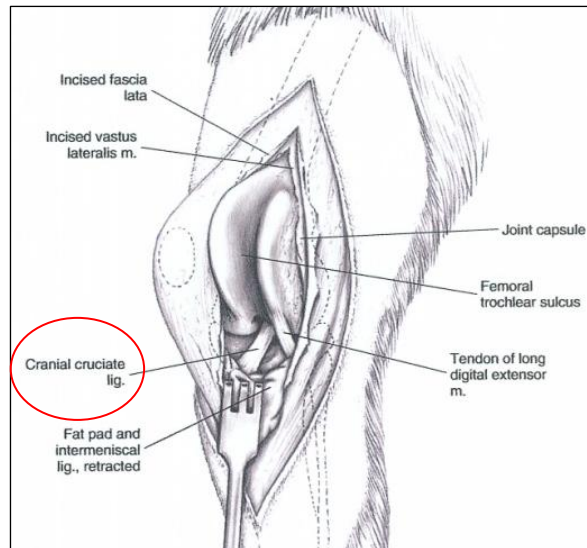


Figure 13: Schéma d'un genou et localisation du LCA

Le modèle est appliqué sur les deux articulations fémoro-tibiales (genoux) de l'animal. La section du LCA induit une instabilité de l'articulation en désaxant les mouvements effectués lors de l'utilisation de cette articulation, ce qui va provoquer un frottement inhabituel et donc une usure accentuée du cartilage. D'après l'étude de mise au point du modèle, les lésions arthrosiques peuvent commencer à apparaître à 7 jours, mais elles sont les plus notables à 3 mois post-chirurgie et permettent des mesures discriminantes. Il s'agit ici d'un modèle physique de l'arthrose, se rapprochant ainsi de la pathologie humaine.

Les animaux sont placés sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane à 3% (lot 42006XN, Laboratoires Axience). La phase d'induction est réalisée dans une cage où 3 rats peuvent être logés au maximum. Puis la phase de maintien se déroule à l'aide d'un masque. Durant toute la période d'anesthésie, les animaux sont placés sur une plaque chauffante afin de maintenir une température corporelle adéquate.

Les animaux sont tondus au niveau des pattes postérieures et du flanc gauche avec une tondeuse électrique. Ensuite les règles d'asepsie et antisepsie sont suivies ; le matériel utilisé est stérilisé par un autoclave avec un cycle à 121°C, un antiseptique est appliqué sur les zones d'incisions cutanées (Povidone iodée cutanée 10%, lot 6038, MYLAN).

Une incision de la peau est faite, avec un scalpel (lame n°11), parallèlement au tendon rotulien sur le bord latéral de ce dernier. Puis une pince est passée en dessous afin d'isoler le tendon et la rotule avec un écarteur. Sous microscope chirurgical, au grossissement x16, la

capsule articulaire est repérée puis incisée. La section du LCA est réalisée avec des ciseaux de microchirurgie ou des ciseaux ORL (Oto-Rhino-Laryngologie) (ces mêmes instruments sont utilisés chez l'humain). Avec le type de ciseaux choisi il faut passer entre les deux condyles du fémur et sectionner le ligament croisé antérieur qui forme une large bande blanche en profondeur (Figure 14).

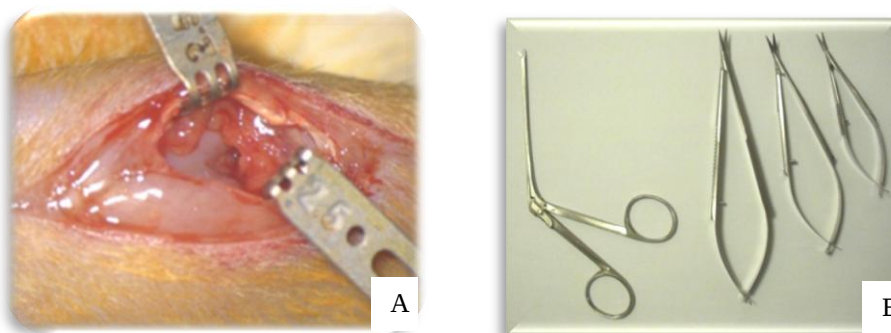


Figure 14 : Localisation du site de Section chirurgicale du LCA (A) ; différents ciseaux utilisés (B) de la gauche vers la droite, ciseaux ORL, différentes tailles de ciseaux de microchirurgie humaine.

Un mouvement dit du « tiroir antérieur » permet de vérifier la section complète. Ce mouvement consiste en un déplacement d'avant en arrière du tibia par rapport au fémur, et qui n'est possible que lors de la section totale du LCA.

Un point de suture interne avec du fil résorbable permet la fermeture de la capsule articulaire, du fil non résorbable en nylon pour la peau.

En fin d'opération, avant le réveil, une dose d'antalgique de buprénorphine 0,05mg/kg (lot F18, Laboratoires Axience) leur est administrée par voie sous-cutanée et une autre dose le lendemain. De la pommade, le Sulmidol® (lot TAM031/01 Laboratoires INTERVET), est appliquée sur les cicatrices, d'une part en prévention d'infections *via* son action bactériostatique, et d'autre part en induisant un effet répugnant pour éviter que les rats ne se rongent les fils de suture. Le réveil se déroule sous une lampe chauffante. Lorsque tous les animaux sont vigiles, environ 5 minutes après la soustraction du masque, et que le contrôle de la mobilité est satisfaisant, les cages repartent en salle d'hébergement.

III.2.3 Suivi des animaux

Un suivi quotidien est réalisé pendant la semaine suivant la chirurgie, mais aussi pendant la semaine suivant les injections.

Dans un premier temps, ce suivi consiste en la pesée, afin de déceler les pertes de poids pathologiques. En effet une perte au-delà de 20% du poids initial constitue un point limite d'expérimentation animale. En considérant un ensemble d'observations associées, cette perte de poids signifie que le pronostic vital est engagé et une procédure d'euthanasie doit être envisagée pour limiter la souffrance. Ce suivi permet aussi de vérifier l'état des sutures et si nécessaire de refaire les points manquants.

Dans un second temps, ce suivi évalue différents paramètres vérifiant l'état de santé général et le niveau de souffrance des animaux. Il intègre :

- les paramètres du comportement animal : une attitude prostrée, dos voûté, agressivité, les mutilations sont autant de signes de souffrance.
- l'apparence du poil.
- la respiration, saccadée, ralentie.
- l'état de la litière (ou des excréments) qui est aussi un indicateur de l'état général d'un animal (traduisant sa prise alimentaire et son niveau de stress).
- la mobilité qui est étroitement surveillée car des dommages collatéraux peuvent survenir.

Aussi, si une souffrance est constatée l'analgésie par buprénorphine à 0,05mg/kg pourra être poursuivie le temps nécessaire. Enfin le suivi des animaux immunodéprimés est poursuivi pendant toute la durée du traitement.

III.2.4 Immunosuppression

Une partie des animaux est traitée par une administration sous-cutanée de ciclosporine A à 10mg/kg/j (Néoral® solution buvable 100mg/mL, lot H5180A, Novartis).

Deux schémas d'administration sont mis en place. Le traitement est instauré 2 jours après la chirurgie d'induction du modèle. Puis, soit il est poursuivi 7 jours après l'injection des cellules (pour un groupe de 15 animaux), soit 1 mois après l'injection (pour un groupe de 16 animaux). Les injections sont réalisées une fois par jour à heure identique, tous les jours,

en changeant le site d'injection afin d'éviter une éventuelle nécrose des tissus. La ciclosporine est préparée extemporanément avant chaque injection sous-cutanée, car sa stabilité en solution saline (NaCl 0,9%) est faible.

Ces animaux immuno-déprimés reçoivent sur une patte la condition contenant les cellules de la FSV et sur l'autre patte le contrôle négatif (soit NI, soit RL).

III.2.5 Patients et Prélèvements de tissu adipeux

Cette étude est réalisée à partir de prélèvements de tissu adipeux provenant de trois patients différents en clinique spécialisée. Chaque prélèvement est attribué à un lot d'animaux. Les patients sont tous de sexe féminin, non obèses, la moyenne d'âge est de 50 ± 9 ans, et la moyenne des Indices de Masse Corporelle (IMC) de $25,6 \pm 3,3$ kg/m². Toutes les données sont regroupées dans un cahier permettant une traçabilité, et un numéro d'identification est donné à chaque patient pour respecter la confidentialité.

Les prélèvements sont réalisés au cours d'une intervention de chirurgie esthétique, sous anesthésie générale. Dans cette étude il s'agit de lipoaspirations abdominales et ilio-lombaires. Le tissu issu de ces prélèvements étant considéré comme un déchet opératoire, une non-opposition à l'utilisation aurait du être établie.

Le protocole de lipoaspiration auquel j'ai pu assister est le suivant : premièrement une infiltration de la zone à prélever par de la lidocaïne associée à de l'adrénaline, le tout dilué dans un large volume de Ringer Lactate. Puis, avec une canule de prélèvement branchée à un système d'aspiration, des mouvements d'aller-retour sont effectués sur toute la zone ciblée. Le tissu adipeux prélevé est recueilli dans un dispositif clos et est transporté à température ambiante jusqu'au laboratoire de recherche.

III.2.6 Extraction des cellules de la fraction stromale vasculaire de tissus adipeux

Le protocole d'extraction des cellules de la fraction stromale vasculaire suivi dans cette étude est celui du kit Arthrokill©, il a été optimisé par l'équipe de R&D de Stemcis (Girard, 2012). Toutes les étapes sont réalisées, tant que possible, sous un Poste de Sécurité Microbiologique de type II. Pour des raisons de confidentialité aucune valeur numérique ne sera communiquée.

La première étape est un protocole de lavages multiples du tissu prélevé. Selon l'aspect du tissu (plus ou moins sanguinolent et liquide), une certaine quantité de tissu est réparti dans des tubes Falcon© avec du Ringer Lactate (lot S4J163, Laboratoires Osalia). Les tubes sont centrifugés. Cette opération est réalisée plusieurs fois afin d'éliminer le plus possible les produits d'infiltration et les molécules inflammatoires résiduelles de la lipoaspiration.

Ensuite le tissu est digéré avec un cocktail enzymatique de collagénases. Le tissu digéré est ensuite centrifugé puis le culot cellulaire est lavé de multiple fois et filtré afin de retenir les fibres qui n'ont pas été complètement digérées. A cette issue, le culot cellulaire de la fraction stromale vasculaire est extrait, la concentration cellulaire est estimée par un échantillon permettant de réaliser un comptage des cellules extraites.

Le comptage s'effectue grâce à des plaques prévues à cet effet avec du Bleu de Trypan. Les comptages sont multipliés et la moyenne obtenue permet de déterminer la dilution nécessaire du culot cellulaire afin d'obtenir une solution mère de cellules en suspension. Le culot est enfin repris dans un volume adapté de RL en attendant les injections selon des conditions choisies.

III.2.7 Injection intra-articulaire

Les injections ont lieu sept jours après la chirurgie de section du LCA. Les animaux sont sous anesthésie générale à l'isoflurane 3%, comme décrit lors de la chirurgie d'induction du modèle d'arthrose. Pour limiter au maximum la durée anesthésie des animaux, une gestion efficace des inductions doit être établie et les animaux ne doivent être mis en induction qu'au dernier moment. Aussi en fonction des conditions injectées, le temps de préparation des seringues est plus ou moins long et doit être pris en compte lors de l'induction de l'anesthésie. Et comme lors de la chirurgie, toutes les règles d'asepsie et antisepsie sont respectées et le matériel est stérile.

Les injections des cellules de la FSV sont réalisées de façon transcutanée dans le genou, après application d'éthanol 70° qui permet de mieux visualiser le tendon rotulien et ainsi de mieux localiser le site d'injection. Une fois l'aiguille insérée dans l'articulation un mouvement de flexion-extension permet d'objectiver la position intra-articulaire de l'aiguille, et l'injection peut alors être faite.

Une aiguille de 25G (16mm) est utilisée ainsi qu'une seringue Hamilton en verre de 50µL ou 100µL. Le volume injecté est de 40µL par genou pour chacune des combinaisons. Après chaque injection les seringues sont rincées avec du RL et les aiguilles changées afin de limiter le risque infectieux.

III.2.8 Bio-polymères

Dans cette étude deux types de bio-polymères seront testés. Leur innocuité a été initialement prouvée chez le rat. Par mesure de confidentialité, ils ne seront pas décrits dans ce rapport. Le premier est un gel réticulé polysaccharidique, et le second se présente physiquement sous la forme d'un gel.

L'injection de ces bio-polymères est délicate car ils se solidifient très rapidement, en moins d'une minute, et ne passent plus au travers de l'aiguille.

III.2.9 Analyse par imagerie : micro-CT

La technique d'imagerie utilisée est la tomographie par rayons X ou micro-CT (x-ray micro-computed tomography). L'image en scanner tridimensionnelle obtenue permet de visualiser les déformations de l'articulation (réduction de l'espace articulaire), les ostéophytes et autres irrégularités de l'os sous-chondral.

Une fois les animaux sacrifiés, les pattes sont prélevées, disséquées, fixées dans du paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) pendant 72h, puis stockées dans de l'éthanol 70°. Ensuite seulement elles sont analysées au scanner. Cette étape est réalisée avec la collaboration de l'équipe de Radiochimie et Imagerie du Petit Animal au niveau de la plateforme d'imagerie du CYROI.

Le système utilisé est Triumph TEP/TEMP/TDM (TriFoil Imaging, Californie), et les paramètres d'acquisition sont les suivants : 55kV, 1024 projections, zoom x3, pendant environ 8 minutes. Ces paramètres permettent d'obtenir une résolution maximale, les Voxels isotropiques étant de 50µm lors de la reconstruction réalisée par un algorithme Feldkamp. Suite à l'acquisition et à la reconstruction des images, l'analyse sera réalisée avec le logiciel Amira 6.0 dont les multiples outils permettent de traiter les images, de réaliser des capture d'image, des vidéos, mais aussi de mesurer des espaces.

Une grille de scoring a été élaborée à partir d'un système de scoring de modalités multiples, le RAKSS (rat arthritis knee scoring system) issu de l'étude de A. Panahifar et al. publiée en 2014.

Chaque partie des articulations, le fémur, le tibia et la rotule, est séparée en régions, antérieure, postérieure et médiale, latérale, ceci afin d'obtenir des zones pour faciliter le scoring. Aussi, différents plans de coupe 2D sont utilisés en fonction des paramètres évalués, leur orientation étant adaptée à chaque partie de l'articulation (Figure 15). Un plan de section coronal (15A) permet d'évaluer l'angle de déviation articulaire (15B) et tous les paramètres concernant la rotule (15C). Un plan de section sagittal (15D) permet d'évaluer l'espace articulaire et la sclérose de l'os sous-chondral (15E). Enfin un plan de section transversal (15F) permet quant à lui d'évaluer les ostéophytes et kystes osseux. Les reconstructions 3D sont aussi observées afin d'orienter les plans de section 2D, d'apprécier l'état global de l'articulation, de confirmer une quelconque anomalie étudiée sur les différentes coupes 2D, mais aussi d'évaluer certains paramètres, les « loose bodies » (calcifications) et les ménisques.

Les paramètres étudiés sur les coupes sont regroupés dans le tableau 2 avec les critères évalués et les points attribués. Chaque zone est scorée, pattes par pattes, et plus le score est important, plus l'articulation est atteinte. Les scores de toutes les zones et de tous les paramètres sont additionnés avec un score maximal total de 48 pour une patte.

L'analyse statistique des scores est faite en deux temps, d'abord les scores globaux (somme de tous les paramètres), puis une analyse par zones où seuls certains critères sont additionnés. Les critères pris en compte pour les quatre régions (fémur latéral, fémur médial, tibia latéral et tibia médial) sont leurs scores « d'ostéophytes » respectifs, les scores des kystes osseux (fémur et tibia) et de la sclérose sous-chondrale (fémur médial, fémur latéral, tibia latéral et tibia médial) Figure 16.

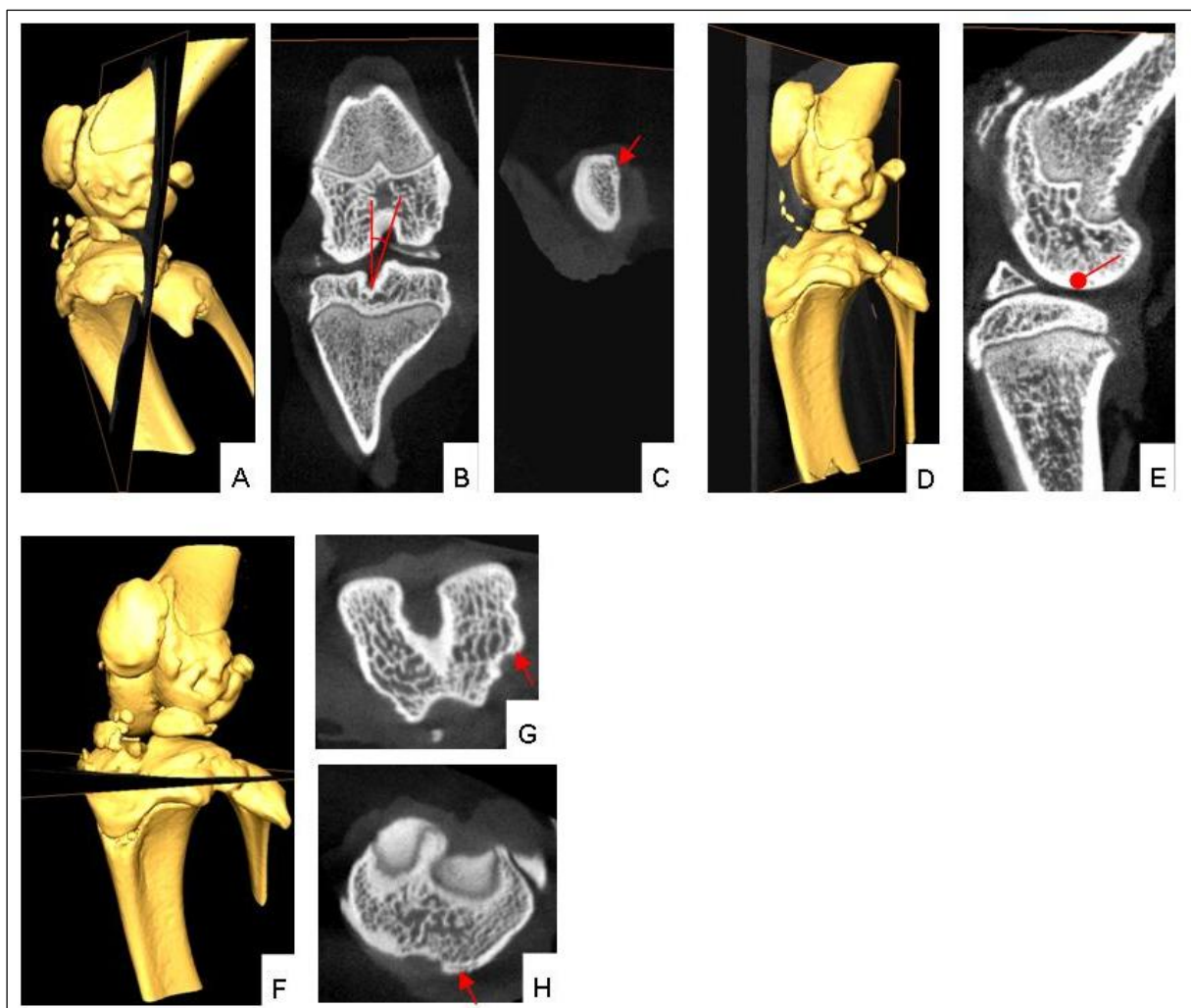


Figure 15: Différentes coupes exploitées lors du scoring μ -CT

A : Plan de coupe coronal sur image 3D

B : Coupe coronale du fémur (en haut) et du tibia (en bas) avec mesure de l'angle de déviation

C : Coupe coronale de la rotule, la flèche localise un ostéophyte

D : Plan de coupe sagittal sur image 3D

E : Coupe sagittale du fémur (en haut) et du tibia (en bas) servant à la mesure de l'espace interarticulaire et à la mesure de la sclérose de l'os sous-chondral (indiquée par le rond)

F : Plan de coupe transversal sur image 3D

G : Coupe transversale du fémur, la flèche localise un ostéophyte

H : Coupe transversale du tibia, la flèche localise un ostéophyte

Paramètres	Localisations	Coupe étudiée	Critères	Points
Ostéophytes	Fémur / Tibia / Rotule Antérieur / Postérieur et Médial / Latéral	Transversale / Coronale	Absence <0,2mm	0
			Défini 0,2mm<x<0,5mm	1
			Large >0,5mm	2
Kystes osseux	Fémur / Tibia / Rotule	Transversale / Coronale	Absence	0
			Présence	1
Sclérose os sous-chondral	Fémur / Tibia Médial / Latéral	Sagittale	Profondeur <3,3mm	0
			0,3mm<x<0,65mm	1
			0,65mm<x<1mm	2
			>1mm	3
Ménisques	Médial / Latéral	3D	Sans déformation	0
			Déformation modérée	1
			Déformation prononcée	2
Calcifications « loose bodies »		3D	Absence	0
			1 (nombre)	1
			2	2
			>3	3
Espace articulaire	Fémur-Tibia	Sagittale	Normal	0
			Réduction modérée	1
			Réduction importante	2

Tableau 2: Critères d'évaluation de l'analyse micro-CT

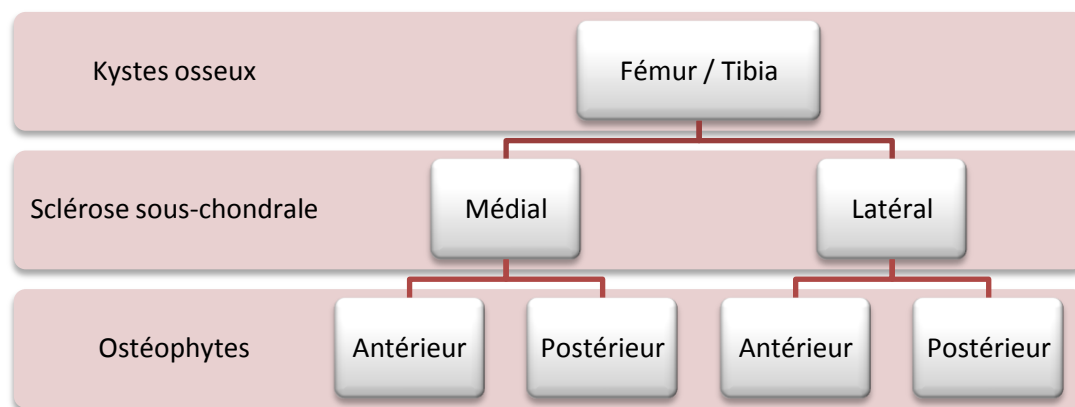


Figure 16: Critères pris en compte pour les scores détaillés

Toute l'analyse est effectuée à l'aveugle, c'est-à-dire sans regarder quelle condition correspond aux pattes évaluées. Les scores sont enregistrés au fur et à mesure dans un tableau préliminaire où ne figurent que les numéros d'identification des animaux. Ils sont ensuite reportés dans un autre fichier regroupant toutes les données de l'étude, les conditions correspondant aux numéros d'identification, les expérimentateurs de la section chirurgicale de LCA, les durées d'anesthésie et toutes remarques éventuelles.

III.2.10 Analyse histologique

Le traitement histologique des pattes conservées dans l'éthanol 70° est sous-traité à un prestataire de services en métropole, Histalim. Le protocole suivi a été élaboré en collaboration avec la société Histalim. La décalcification est réalisée avec une solution de Morse (Acide Formique + Sodium citrate), pendant 5 jours, à 27°C. L'inclusion est réalisée classiquement dans des blocs de paraffine. Pour obtenir une qualité de coupe optimale, le ligament rotulien doit être plaqué au fond du moule et l'articulation doit être maintenue dans cette position durant toute l'inclusion. Les coupes sont des sections coronales et ont été faites tous les 200µm. Elles font 4µm d'épaisseur. Les coupes sont ensuite colorées au safranine-O/fast green qui marque les protéoglycanes présents dans la MEC du cartilage.

Les coupes réalisées sont analysées avec le logiciel NDP.view2. La première partie de l'analyse des coupes histologiques correspond à l'identification des différentes régions: le fémur, avec ses zones d'ossification caractéristiques formant deux ronds, le tibia où la densification forme une ligne continue en forme de « v », le côté latéral, identifiable par la diminution d'épaisseur de l'os du tibia marquant l'insertion du péroné, le côté médial, à l'opposé. Ces régions forment les quatre zones d'analyse. Les ménisques quant à eux sont assez faciles à voir, comme les ligaments et la membrane synoviale (Figure 17).

Une grille de scoring a été mise au point à partir du référentiel des recommandations de l'OARSI (OsteoArthritis Research Society International) publiées par N. Gerwin et al. en 2010. Les paramètres et critères évalués sont regroupés dans le tableau 3 ci-dessous et ne concernent que le cartilage. Les 4 zones identifiées seront scorées indépendamment, mais la somme des 4 scores ne sera pas réalisée. Sur certaines coupes les zones ne sont pas analysables, ceci induisant un biais dans l'analyse statistique, un exemple en figure 18.

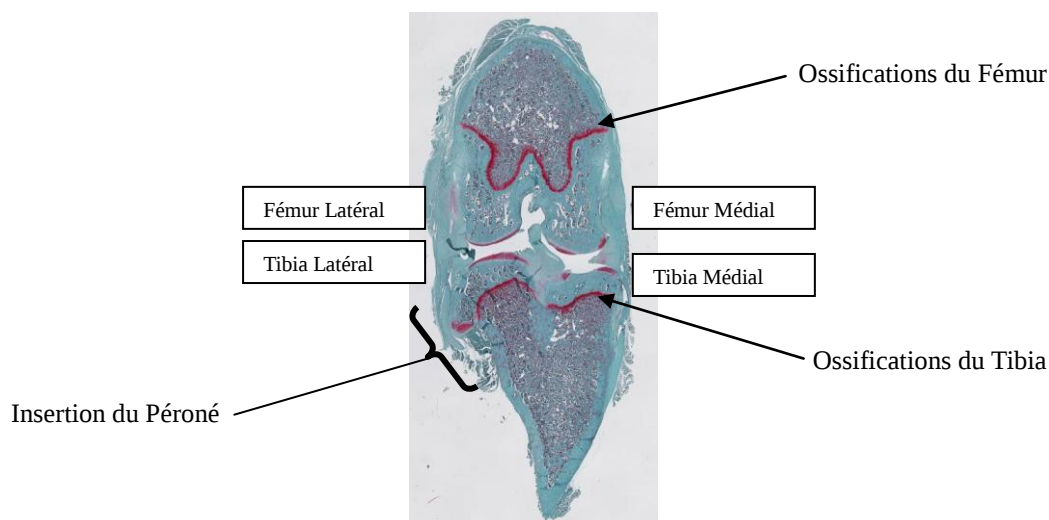


Figure 17 : Identification des zones sur une coupe histologique

Paramètres	Critères	Points
Surface	Lisse	0
	Légèrement irrégulière	1
	Perte d'intégrité (déchirures)	2
Couche superficielle	Cellules présentes partout	0
	3/4	1
	1/2	2
	1/4	3
	Cellules absentes	4
Organisation structurale	Normale	0
	2 couches anormales	1
	Complètement anormale	2
Fibrillation	Aucune fissure	0
	Déchirure mais pas fissure	1
	Fissure zone condensation	2
	Fissure sur plus d'une zone	3
Ménisques	Au centre	0
	Hors articulation	1

Tableau 3: Critères d'évaluation de l'analyse histologique

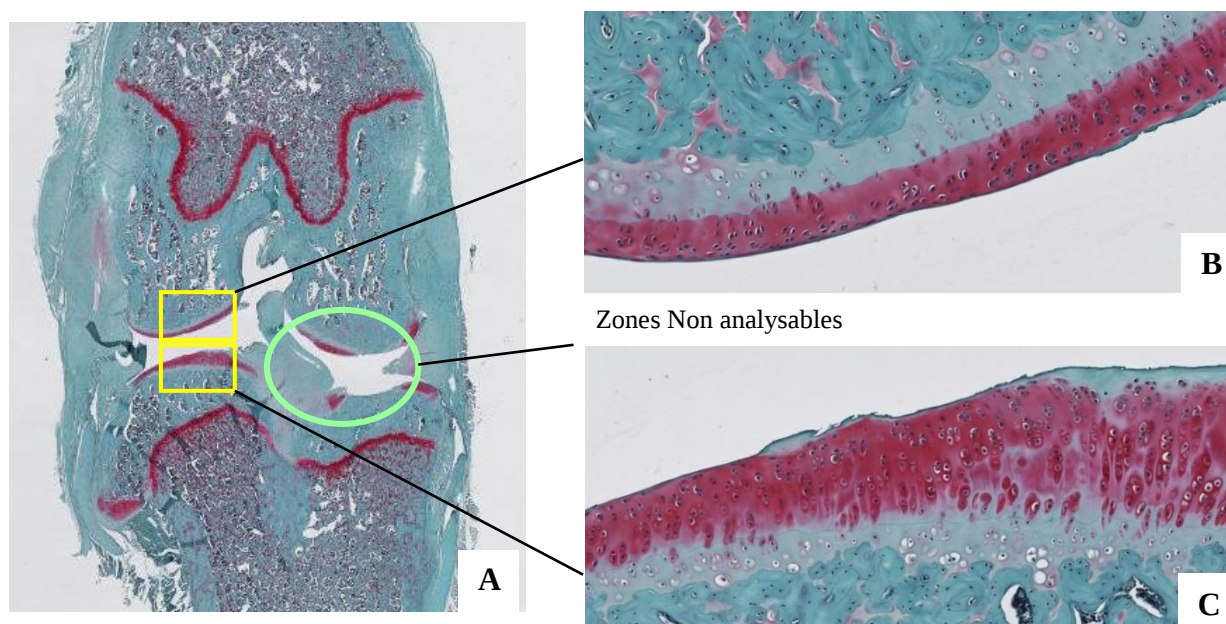


Figure 18 : Zones cibles pour le scoring (A); Cartilage du Fémur latéral (B); Cartilage du Tibia latéral (C)

III.2.11 Statistiques

Dans notre étude le nombre d'échantillon est inférieur à 30 ($N < 30$), il faut donc réaliser des tests non paramétriques sur séries non appariées. Les tests de Kruskal-Wallis (si plus de trois conditions comparées) et Mann-Whitney (si deux conditions comparées) sont appliqués et un risque α de 5% est choisi. Les tests sont réalisés en bilatéral. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPadPrism 6.

III.3 Résultats

Les résultats présentés sont des résultats préliminaires, en effet seules 4 conditions du lot 1 ont été analysées et sont détaillées ci-après, à partir de $n=5$ échantillons pour chaque condition.

Les quatre conditions choisies sont : l'injection de Ringer Lactate qui sert de contrôle, l'injection de cellules de FSV, l'injection du bio-polymère A seul et enfin l'injection de bio-polymère A en association avec des cellules de FSV.

III.3.1 Suivi des Animaux

Lors des observations, aucun problème n'est apparu, aucun signe de souffrance n'a été décelé, quelques rougeurs autour des yeux ont parfois été notées et se sont résorbées spontanément. L'utilisation de gel ou de gouttes ophtalmiques aurait pu pallier à la sécheresse induite par l'anesthésie. Les hématomes se sont résorbés rapidement et aucune inflammation n'a été relevée. Aussi la cicatrisation a été rapide et sans problème. Cet état général satisfaisant est confirmé par les courbes de suivi de poids.

Ces courbes de poids ont été réparties par condition et par lot. Seuls les graphiques du lot 1 sont présentés en figure 19. Les conditions concernant le bio-polymère A sont présentées sur le même graphique car ce sont les mêmes animaux qui reçoivent les deux conditions.

Au premier jour d'expérimentation la moyenne des poids est de $260,4 \pm 11,8$ g. Aucun animal n'a atteint le seuil critique d'une diminution de 20% par rapport au poids initial. Ces courbes de poids sont un indicateur relatif de l'innocuité des injections. Les mêmes tendances ont été retrouvées chez la majorité des animaux. Premièrement, un pic de prise de poids est presque systématiquement observé les jours suivants les interventions sous anesthésie

générale. Ensuite, une diminution du poids est observée. Les mesures de poids n'ont pas été effectuées les jours 5, 6 et 11 afin de respecter la tranquillité des animaux mais une observation générale a eu lieu. Enfin les poids sont relativement stables durant le suivi, et en fin d'expérimentation la moyenne des poids est de $314,5 \pm 15,6$ g avec une prise de poids moyenne de $54 \pm 10,5$ g.

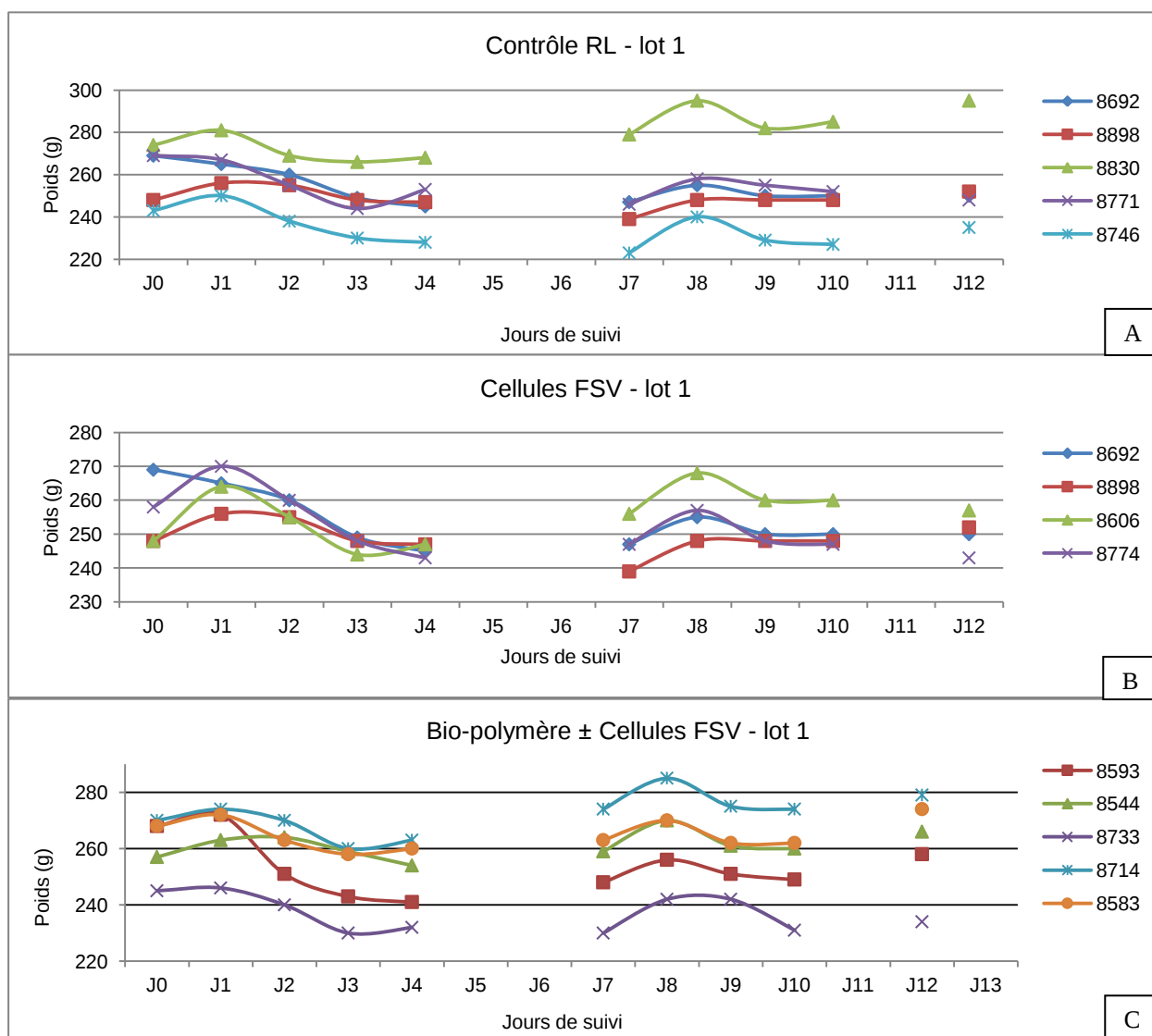


Figure 19 : Courbes de suivi de poids du lot 1 : contrôle Ringer Lactate (A) ; cellules FSV (B) ; Bio-polymère A avec et sans association de cellules FSV (C) ; le modèle chirurgical est induit à J0 ; l'injection des cellules de FSV est à J7. Pour chaque condition, les 5 rats (correspondants aux pattes) sont représentés, sauf pour la condition des cellules FSV qui n'en contient que 4. Les chiffres en légende, sur la droite, sont les numéros d'identification des rats.

Un rat du lot 1 a présenté une paralysie progressive des pattes postérieures, débutant à gauche au bout de 41 jours post-chirurgie du LCA, se propageant à droite en 6 jours, puis remontant vers le bassin. Les analyses n'ayant rien révélé, la décision d'euthanasie a été prise en accord avec le vétérinaire responsable. L'autopsie ainsi que l'analyse micro-CT n'ont pas montré d'anomalie au niveau des genoux, si ce n'est une arthrose classique, il n'y avait pas de signe de tumeur. Ce rat est donc exclu de l'étude, il était porteur d'une condition Contrôle RL (à droite) et d'une condition Cellules de FSV seules (à gauche, côté de la paralysie). Ceci explique qu'il n'y a que $n = 4$ pattes pour la condition « cellules FSV ».

III.3.2 Analyses Imagerie micro-CT

Les observations 3D révèlent des atteintes caractéristiques comme un décalage de l'axe fémoro-tibial, des ménisques déformés voire écrasés et le plateau tibial fracturé, la présence d'ostéophytes plus important sur le fémur médial. Ces observations 3D permettent de noter un aspect global des pattes. Lors de la levée de l'aveugle, on note que les pattes les plus atteintes sont celles correspondant aux contrôles (RL ou NI ; et Bio-polymère seul). Les pattes recevant un traitement comprenant des cellules de FSV ont un meilleur aspect visuel (Figure 20).

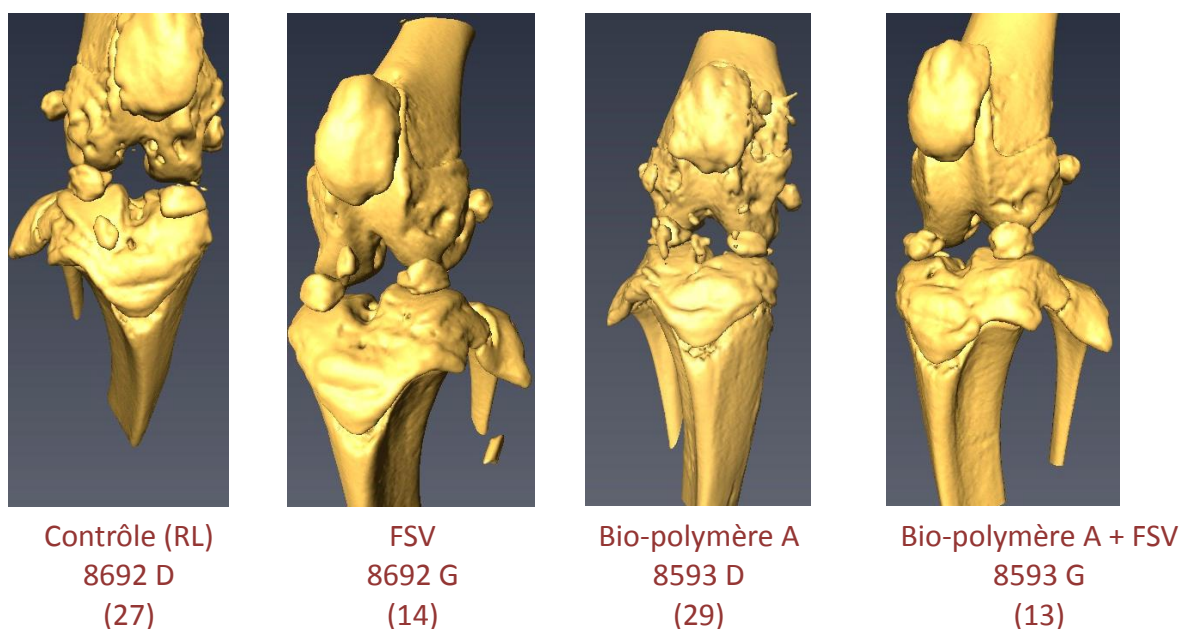


Figure 20 : Reconstruction 3D après analyse micro-CT : de gauche à droite : la condition contrôle, les cellules de FSV, le bio-polymère seul et l'association bio-polymère avec les cellules de FSV, avec en dessous les identifications et entre parenthèses les scores respectifs.

Les premières données sont issues d'une analyse des scores μ -CT en fonction des paramètres expérimentaux. Il n'existe pas de corrélation ni entre la prise de poids, ni le poids initial, ni le poids final, et le score obtenu à l'analyse μ CT, toutes conditions confondues (Figure 21 A), et pour chacune des conditions séparément. De même, il n'apparaît pas de corrélation avec la durée d'anesthésie lors de l'induction du modèle chirurgical (Figure 21 B). Enfin il n'y a pas de différence significative entre les scores μ -CT (Mean $\pm$ Standard Error of Mean SEM) deux expérimentateurs ayant réalisés la section du LCA ($p = 0,58$) (Figure 21 C).

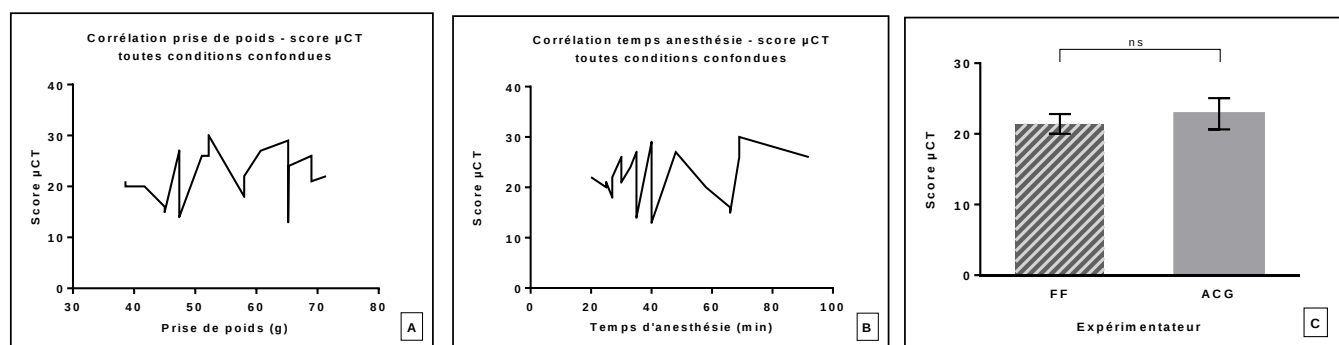


Figure 21: Graphiques des résultats de corrélation entre le score μ -CT et : la prise de poids (A) ; la durée de l'anesthésie (B) ; l'expérimentateur (C) FF = Franck FESTY, ACG = Anne-Claire GIRARD ; ns = non significatif.

Dans un premiers temps, une analyse des scores globaux a été réalisée. Les résultats de l'analyse micro-CT des quatre conditions sélectionnées sont présentés ci-après sur la figure 22. Le test de Kruskal-Wallis a permis de comparer toutes les conditions entre elles, mais il n'a pas révélé de différence significative ($p = 0,67$). De plus les quatre conditions ont été comparées deux à deux par un test de Mann Witney, et encore une fois aucune différence significative n'est apparue. Ces résultats ne sont que préliminaires, ils correspondent seulement à une partie des échantillons de l'étude. Cependant, on remarque une tendance à la baisse des scores correspondant à des conditions impliquant les cellules de la FSV (seules ou associées au bio-polymère A) par rapport au contrôle Ringer Lactate (diminution de 14,6% et 17,9% respectivement) (Figure 22).

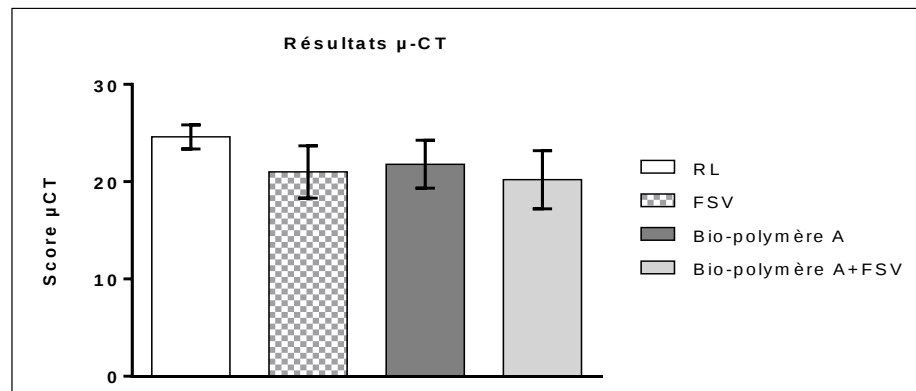


Figure 22 : Graphique des résultats globaux de l'analyse μ -CT : Moyenne $\pm$ SEM ; contrôle RL (blanc) ; cellules de la FSV seules (carreaux) ; Bio-polymère A seul (gris foncé) ; Bio-polymère A associé avec des cellules de la FSV (gris clair).

Dans un second temps, une analyse plus détaillée, par condition et par zone, a été réalisée. Les résultats sont présentés en figure 23. En analysant chaque condition, lors de la comparaison des zones latérale-médiale et fémur-tibia, aucune différence significative n'apparaît dans les analyses statistiques. Cependant, les scores semblent supérieurs pour le fémur comparé au tibia, et plus légèrement élevés pour le côté médial surtout dans la condition Bio-polymère associé aux cellules de la FSV.

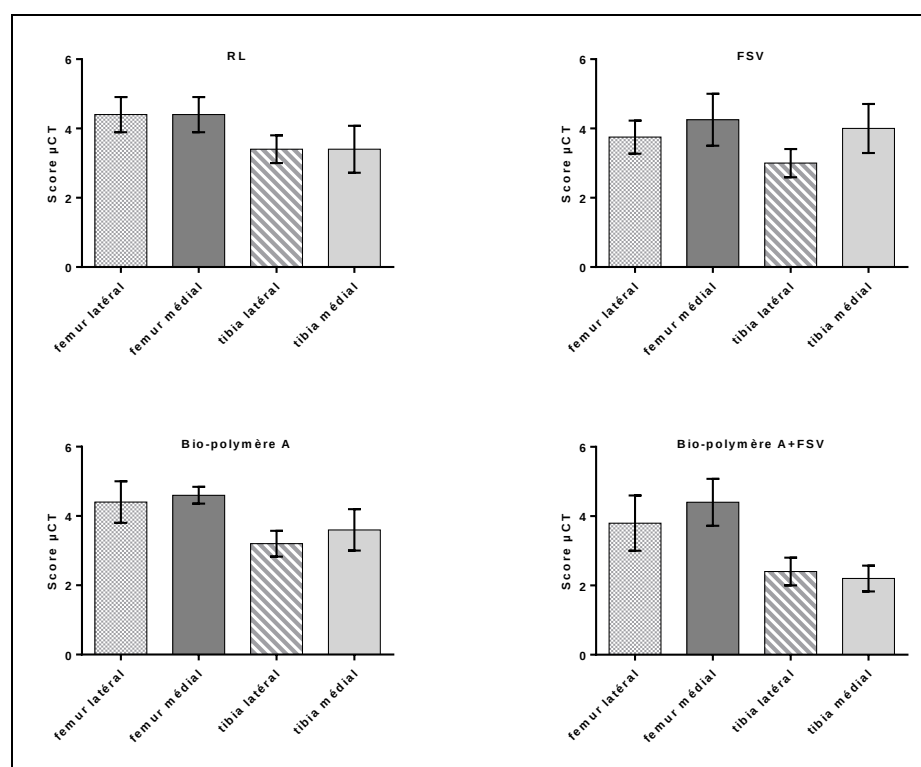


Figure 23 : Scores de μ -CT de chaque condition en fonction des zones articulaires (fémur latéral, fémur médial, tibia latéral, tibia médial). L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative

Enfin, une analyse de chacune des 4 régions en fonction des différentes conditions injectées est réalisée, et semble être la plus appropriée pour cette étude. On n'obtient pas de différence significative. Cette analyse confirme aussi les premières tendances observées, les scores concernant les fémurs sont plus élevés et les conditions mettant en jeu les cellules extraites de la FSV obtiennent des scores inférieurs par rapport au contrôle RL (Figure 24). Par contre le bio-polymère seul ne semble pas donner de meilleurs résultats que le contrôle. En revanche le bio-polymère associé aux cellules de la FSV tend à obtenir le meilleur score sur le tibia médial ($p = 0,067$).

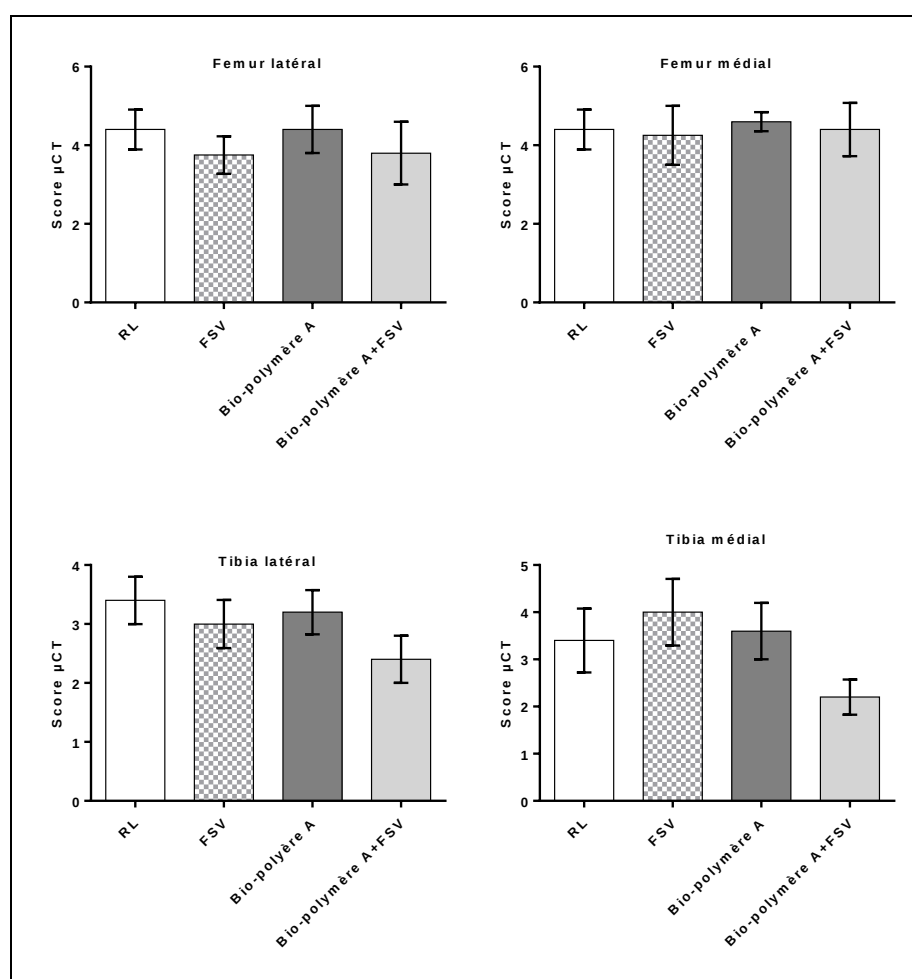


Figure 24 : Scores μ -CT pour chaque zone articulaire en fonction des 4 conditions testées (RL, Cellules de FSV humaine, Bio-polymère et association Bio-polymère avec des cellules de FSV humaine). L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative.

III.3.3 Analyses Imagerie Histologique

Les expérimentations nécessaires afin d'obtenir cette partie des résultats sont en cours de réalisation, ainsi les résultats ne peuvent être présentés à ce jour.

Cependant le traitement d'une étude préliminaire a été réalisé, dans le but de conforter les paramètres techniques mais aussi et surtout d'affiner les critères d'évaluation. Sur 21 pattes analysées, 7 fémurs médiaux ne sont pas analysables, par défaut technique, 1 tibia médial et 1 fémur latéral. Il reste donc 12 pattes où les scores globaux peuvent être comparés, soit environ 57% des données.

III.4 Discussion

La stratégie thérapeutique choisie est une injection à un stade précoce de la maladie, 7 jours après l'induction du modèle. Selon des études internes préliminaires et selon d'autres études (Ter Huurne et al. 2012) cette stratégie permet d'observer un effet protecteur de l'injection de cellules souches adipeuses. L'indication semble tendre vers un traitement curatif pour les stades précoces de la maladie, qu'il semble difficile à transposer chez l'Homme, au vu du diagnostic à un stade souvent tardif.

Deux remarques sont à faire au sujet des conditions injectées, la première concerne la caractérisation exacte des populations cellulaires injectées. Lors de cette étude, l'analyse phénotypique des cellules extraites a été compromise. Ainsi, il n'y a ni sélection de la population par culture cellulaire, ni identification, contrairement à ce qui est souvent réalisé dans d'autres études précliniques (Veronesi et al. 2013).

La seconde, parmi les conditions non présentées dans ce rapport, l'immunosuppression doit fournir des données concernant une injection hétérologue, et même xénologue, de cellules de FSV (cellules humaines injectées chez le rat). Ces données semblent peu pertinentes d'un point de vue développement clinique d'un tel dispositif, puisqu'il s'agirait d'une utilisation en traitement autologue chez l'Homme. En revanche, elles sont primordiales pour l'étude préclinique et l'analyse doit déterminer si cette immunosuppression permet de protéger les cellules d'une dégradation prématurée. Dans le cas où cette immunosuppression révèle des résultats significativement différents, elle devra être mise en place pour tous les animaux, lors des futures études. Alors un suivi plus rigoureux de la ciclosporinémie devrait

être instauré avec des prises de sang pour un dosage régulier.

L'étude préclinique est réalisée sur un grand nombre d'animaux, et en accord avec la règle des 3R en expérimentation animale, il s'agit d'un nombre minimal d'animaux qui pouvait rendre significatifs les résultats obtenus. Avec un nombre de 5 pattes/condition/FSV de patient, et 3 sources de FSV issues de 3 patients, cela permet aussi d'avoir une variabilité interindividuelle (humaine et animale) acceptable. Une remarque peut être faite car l'étude est menée seulement sur des rates, il aurait fallu autant de rats mâles pour pouvoir comparer, mais cela va à l'encontre de la règle de réduction du nombre d'animaux. Aussi lors d'une étude interne préliminaire il n'y a pas eu de différence significative observée entre les 2 sexes. Le choix des femelles s'est alors fait sur un critère pratique, devenant moins grasses, les opérations et dissections sont plus faciles à réaliser. Une autre remarque peut être apportée, chaque condition ne dispose pas de son contrôle négatif sur le même animal. En effet ceci aurait augmenté le nombre de rats à inclure au-delà des recommandations éthiques.

La relative stabilité des poids pendant le suivi et la prise de poids observée en fin d'expérimentation montrent un bon développement des animaux, en bonne santé. Cette prise de poids révèle aussi une plus grande sédentarité des animaux. De plus aucun signe de souffrance n'ayant été détecté, ceci apporte une confirmation de l'innocuité clinique de ces différentes conditions testées, principalement concernant les bio-polymères. Un biais concerne ce paramètre. Le poids mesuré est celui de l'animal entier, hors chacune des deux pattes arrière disposent d'une condition différente. Quand bien même il y aurait une variation pathologique, la mise en cause d'une condition plutôt qu'une autre semble difficilement envisageable.

Les différentes variations de poids n'étant pas pathologiques, elles pourraient être expliquées selon l'hypothèse d'un effet secondaire potentiel, soit de l'anesthésique, soit de la buprénorphine injectée, qui serait plutôt un effet orexigène. La diminution qui suit correspondrait à un retour à un état normal de prise alimentaire. Les mesures étant réalisées à la même période de la journée, à savoir le matin, ceci affranchit de la prise de poids liée à la prise alimentaire récente.

Cependant la souffrance des animaux dont celle des rats peut être évaluée de différentes façons. Le suivi clinique est fiable et facile à réaliser, non invasif et perturbant peu la tranquillité des animaux, mais cela ne permet d'obtenir que des résultats qualitatifs. Sur des

animaux comme les rats, il existe une autre technique qui consiste à mesurer les ultra-sons émis lorsque l'animal ressent une douleur (Han et al. 2005). C'est aussi une technique non invasive mais qui nécessite un équipement plus particulier et une manipulation des animaux. On peut aussi y associer des tapis d'empreinte qui servent à identifier une boiterie ou une gêne lors des déplacements. Ces deux dernières techniques permettraient d'une part de détecter plus finement une douleur, et d'autre part d'obtenir des résultats plus précis. Ces mesures fournissent des résultats quantitatifs permettant de définir des niveaux de douleur (Piel et al. 2015).

L'analyse des scores μ -CT en fonction des différents paramètres expérimentaux, le poids, le temps d'anesthésie et les expérimentateurs, assure une certaine qualité des résultats. En effet le modèle étant chirurgical il nécessite un geste particulier qui peut varier selon les expérimentateurs. Les gestes ont été validés par des études préliminaires et l'absence de différence significative dans cette étude confirme qu'il n'existe pas de biais lié à l'expérimentateur. Ces résultats révèlent aussi que l'on s'affranchit des biais liés à la durée de l'opération lors de la section chirurgicale. Concernant la prise de poids des animaux, ce paramètre correspond à un état physiologique de l'animal, il ne s'agit pas d'étudier un facteur de risque comme l'obésité par exemple. On ne note pas de différence significative quel que soit le paramètre de poids pris en compte. Ces données permettent de valider l'objectivité des autres résultats puisqu'il n'y pas de biais expérimental identifié.

Les résultats de l'analyse μ -CT sont des résultats préliminaires, ils sont obtenus à partir d'un nombre restreint d'échantillons, ce qui peut expliquer que plusieurs différences notées ne sont pas encore significatives. Cependant ils permettent d'observer certaines tendances.

Les scores globaux (Figure 22) obtenus avec les cellules seules, le bio-polymère seul, et l'association des deux, semblent inférieurs à ceux du contrôle ayant reçu uniquement l'injection de RL. Une explication de la diminution concernant le bio-polymère seul pourrait être que celui-ci agirait comme un agent de supplémentation chondroprotecteur. Concernant les cellules, ce serait plutôt leurs sécrétions paracrines de cytokines et autres facteurs qui seraient relargués lors de l'injection qui auraient un rôle anti-inflammatoire en premier lieu (Ter Huurne et al. 2012). Ceci permettant de protéger l'articulation des cascades de signalisations qu'induit l'inflammation, et aboutissant à la surproduction d'enzymes de dégradation (Ter Huurne et al. 2012). De plus il a été montré que les cellules injectées ne

demeurent pas au site d'injection. En effet le marquage fluorescent n'est plus retrouvé 5 jours après leur injection (Ter Huurne et al. 2012). Deux hypothèses sont alors possibles, soit les cellules meurent, soit elles migrent. C'est pour éviter cette « fuite » des cellules que la bio-ingénierie tissulaire est testée.

Lors de l'analyse des scores détaillés, le côté médial et les fémurs semblent plus atteints que le côté latéral et les tibias. Une hypothèse peut être que lors de l'injection, le premier compartiment étant en contact avec ce qui est injecté est le tibia, le « traitement » serait ainsi plus « efficace ».

L'analyse des scores détaillés révèle une réduction des scores concernant la condition du bio-polymère associé aux cellules par rapport aux cellules seules (Figure 24). Deux hypothèses semblent se retrouver ici, la première concerne un potentiel effet chondroprotecteur du bio-polymère, la seconde serait le caractère plus efficace des cellules *via* leur maintien présumé dans le bio-polymère. Ce serait donc une action synergique qui reste bien sûr à vérifier.

Afin de confirmer les tendances observées en μ -CT, l'analyse histologique définira les lésions structurelles du cartilage. La non-comparabilité d'environ 40% des résultats histologiques globaux confirme l'intérêt de séparer en différentes zones les articulations afin de maintenir une comparabilité optimale. Ceci devrait permettre de cibler les zones de l'articulation les plus atteintes par la maladie, et celles où les traitements seraient les plus efficaces. En association avec les résultats de μ -CT, les prochaines analyses d'études se concentreront sur ces zones.

De plus, il faut identifier le problème à l'origine de cette impossibilité de scorer pour optimiser les études et analyses ultérieures. Tant sur un aspect scientifique, avec des termes employés les plus objectifs possibles, que sur un aspect technique, une validation des critères est nécessaire. Des anomalies telles que des défauts de coloration, ou encore de coupe (angle, épaisseur) peuvent être interprétées de façon erronée. Le décalage articulaire induit par le modèle chirurgical d'arthrose pourrait expliquer certains défauts de coupe.

Cette étude regroupe à la fois des acquis concernant les propriétés des cellules employées, et aussi des innovations dans le domaine de la thérapie cellulaire. En effet les cellules souches issues du tissu adipeux sont largement utilisées en recherche dans l'arthrose, ainsi que le modèle de section du ligament croisé antérieur comme le révèle la revue

bibliographique publiée en 2013 par F. Veronesi et al. Leur haute tolérance immunologique ainsi que leur caractère anti-inflammatoire ont été prouvé (Jorgensen 2013, Ter Huurne et al. 2012). Leur potentiel d'action dans l'arthrose, seules ou associées, est encore en cours de définition (Ahmed et al. 2014 ; Veronesi et al. 2013). Les techniques d'analyses sont aussi conventionnelles, elles n'apportent pas de nouveauté. En revanche dans ces études, les cellules sont au moins amplifiées en culture afin de ne sélectionner que les phénotypes mésenchymateux, une prédifférenciation peut même être induite. Ce type d'étude est en cours d'essai clinique chez l'Homme (projet ADIPOA), ce qui atteste de l'avancée considérable de cette stratégie. Alors l'innovation présentée dans cette étude est de s'affranchir de la culture cellulaire (et des contraintes associées comme des milieux de grade GMP), et de proposer un « traitement » en une seule étape. En effet il n'y pas encore d'étude *in vivo* utilisant les ASC « en une étape » (Veronesi et al. 2013).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'arthrose, pathologie grandissante avec le changement des populations (styles de vies, vieillissement, etc.), souffre d'une impasse thérapeutique. Les symptômes sont maîtrisés, mais leurs étiologies ne sont ni établies ni contrôlées. Les recherches ont abouti au constat qu'il serait difficile de mettre au point un traitement curatif efficace, alors les stratégies s'orientent vers le ralentissement de la progression, avec la régénération tissulaire et la thérapie cellulaire.

La thérapie cellulaire connaît un essor particulier depuis ces dernières années, les différents types et sources de cellules en font un domaine étendu. En fonction des pathologies, des contraintes éthiques et scientifiques les stratégies sont nombreuses. L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses présentent de nombreux avantages et son application dans l'arthrose semble se confirmer. Les études précliniques, mais aussi cliniques se développent de plus en plus afin de déterminer la stratégie thérapeutique optimale, mais aussi afin de mieux en comprendre les mécanismes. L'association de l'ingénierie tissulaire est étudiée largement en préclinique, en revanche le passage au stade clinique reste délicat.

L'étude préclinique *in vivo* réalisée par la société STEM CIS est encourageante aux vues des résultats préliminaires, soutenue par les données vétérinaires sur le terrain. Agissant ainsi en synergie avec les cellules, le bio-polymère semble avoir des avantages pouvant être un effet chondroprotecteur, mais aussi un effet de maintien des cellules au site d'injection. De plus, de meilleurs résultats sont observés pour certaines régions de l'articulation. C'est le cas du tibia médial, à ce stade de l'analyse. Ceci signifie aussi qu'une séparation en 4 zones articulaires (fémur latéral, fémur médial, tibia latéral et tibia médial) semble être une bonne stratégie d'analyse. Certaines limites demeurent, le mécanisme d'action de ces cellules injectées, leur devenir exact, l'effet de l'immunosuppression, mais aussi l'analyse histologique qui reste à valider.

Cette étude doit être confirmée par d'autres études. Il faut affiner les conditions en ne sélectionnant que les plus pertinentes, la dose de cellules injectée doit être définie, le type de bio-polymère utilisé aussi. Ceci est le début d'un long travail, composé de plusieurs études semblables à celle-ci, mais aussi des analyses de cas cliniques avec l'utilisation de tels dispositifs médicaux chez le chien et le cheval, qui apporteront les justifications nécessaires à l'élaboration d'une étude clinique chez l'Homme. D'autres études concernant la méthode

d'extraction des cellules de la FSV sont en cours de réalisation au sein de l'équipe STEM CIS et devrait aboutir à un brevet.

Dans l'objectif final du projet, qui est rappelons-le de développer un kit thérapeutique, l'utilisation d'un bio-polymère pourrait compliquer la mise sur le marché, avec des analyses supplémentaires de toxicité, de conditions de conservation, mais aussi une entente avec l'entreprise le développant au sujet du brevet déposé. Ce sont des coûts supplémentaires qu'il ne faut pas négliger. Ainsi le bénéfice qu'apporterait ce bio-polymère est à évaluer avec précision. L'indication de ce type de DM est aussi à préciser, selon cette première étude, le traitement de stades précoces dans l'arthrose du genou serait la plus probable.

Au terme de cette étude, mais aussi à travers une étude bibliographique plus large, l'arthrose est un axe de recherche important, tant par son objectif scientifique que démographique. La thérapie cellulaire semble s'imposer dans cette pathologie, ainsi que dans la majorité des maladies dégénératives. Les cellules souches mésenchymateuses présentent de nombreux avantages, mais leur caractérisation est souvent la source de différents entre les chercheurs. Une alternative pourrait être l'utilisation d'une population plus hétérogène, la fraction stromale vasculaire. Cette fraction comporte des CSM, donc possède leurs avantages (immuno-modulation, effet anti-inflammatoire), mais elle comporte aussi de nombreux autres produits (issus de la mort cellulaire liée au protocole d'extraction) pouvant avoir des effets délétères. Cette alternative doit encore être étudiée et caractérisée fonctionnellement en préclinique avant d'envisager son utilisation chez l'Homme.

BIBLIOGRAPHIE

- AHMED MR, MEHMOOD A, BHATTI FU, KHAN SN, RIAZUDDIN S. Combination of ADMSCs and chondrocytes reduces hypertrophy and improves the functional properties of osteoarthritic cartilage.
Osteoarthritis Cartilage. 2014 Nov;22(11):1894-901.
- AIGNER T, SACHSE A, GEBHARD PM, ROACH HI. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention.
Adv Drug Deliv Rev. 2006 May 20;58(2):128-49.
- ANTONY-DEBRE I, HAMIDI S, NOROL F, VAINCHENKER W, RASLOVA H. Cellules souches pluripotentes induites : de l'historique à l'application.
Hematologie 2013 ; 19 : 20-32.
- BERENBAUM F. La physiopathologie de l'arthrose – cours francophone de rhumatologie
Site internet de la Société Française de Rhumatologie, consulté le 3 septembre 2015.
www.rhumatologie.asso.fr/02-Congres/2008/Nice2008Vendredi.asp
- BISWAS A, HUTCHINS R. Embryonic stem cells.
Stem Cells Dev. 2007 Apr;16(2):213-22.
- BORNES TD, ADESIDA AB, JOMHA NM. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review.
Arthritis Res Ther. 2014;16(5):432.
- BRUNO S, DEREGIBUS MC, CAMUSSI G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation.
Immunol Lett. 2015 Jun 15. pii: S0165-2478(15)00105-4.
- CHARBORD P, POUGET C, BINDER H, DUMONT F, STIK G, LEVY P, ALLAIN F, MARCHAL C, RICHTER J, UZAN B, PFLUMIO F, LETOURNEUR F, WIRTH H, DZIERZAK E, TRAVER D, JAFFREDO T, DURAND C. A systems biology approach for defining the molecular framework of the hematopoietic stem cell niche.
Cell Stem Cell. 2014 Sep 4;15(3):376-91.
- CLOUET J, VINATIER C, MERCERON C, POT-VAUCEL M, MAUGARS Y, WEISS P, GRIMANDI G, GUICHEUX J. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage.
Drug Discov Today. 2009 Oct;14(19-20):913-25.
- DA SILVA MEIRELLES L, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.
J Cell Sci. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.
Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

- FERNANDES L, HAGEN KB, BIJLSMA JW, ANDREASSEN O, CHRISTENSEN P, CONAGHAN PG, DOHERTY M, GEENEN R, HAMMOND A, KJEKEN I, LOHMANDER LS, LUND H, MALLIN CD, NAVA T, OLIVER S, PAVELKA K, PITSILLIDOU I, DA SILVA JA, DE LA TORRE J, ZANOLI G, VLIET VLIELAND TP; EUROPEAN LEAGUE AGAINST RHEUMATISM (EULAR). EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis.
Ann Rheum Dis. 2013 Jul;72(7):1125-35.
- GERWIN N, BENDELE AM, GLASSON S, CARLSON CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat.
Osteoarthritis Cartilage. 2010 Oct;18 Suppl 3:S24-34.
- GIRARD ANNE-CLAIRE. Thèse d'université : Thérapie à partir du tissu adipeux : de la chirurgie esthétique et reconstructrice à la thérapie cellulaire. Application à la régénération des tendons chez les chevaux. *Université de la Réunion*, soutenue le 12 décembre 2012.
- GLYN-JONES S, PALMER AJ, AGRICOLA R, PRICE AJ, VINCENT TL, WEINANS H, CARR AJ. Osteoarthritis.
Lancet. 2015 Mar 3. pii: S0140-6736(14)60802-3.
- GNECCHI M, ZHANG Z, NI A, DZAU VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy.
Circ Res. 2008 Nov 21;103(11):1204-19.
- HAN JS, BIRD GC, LI W, JONES J, NEUGEBAUER V. Computerized analysis of audible and ultrasonic vocalizations of rats as a standardized measure of pain-related behavior.
J Neurosci Methods. 2005 Feb 15;141(2):261-9.
- JONES DL, WAGERS AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Jan;9(1):11-21.
- JORGENSEN C. Mesenchymal stem cells: uses in osteoarthritis.
Joint Bone Spine. 2013 Dec;80(6):565-7.
- JOURNAL OFFICIEL DU 13 FEVRIER 2001, Décret n°2001-131 portant publication de la Convention Européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, adoptée à Strasbourg le 18 mars 1986 et signée par la France le 2 septembre 1987, pp2369-2395.
- JOURNAL OFFICIEL N°0182 DU 7 AOUT 2013, Texte 1 : LOI n° 2013-715 du 6 août 2013 tendant à modifier la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires. pp 13449.
- KIMBREL EA, LANZA R. Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic.
Nat Rev Drug Discov. 2015 Sep 22.

- KOBOLAK J, DINNYES A, MEMIC A, KHADEMHOSEINI A, MOBASHERI A. Mesenchymal stem cells: identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro engineering of their niche. *Methods*. 2015 Sep 15. pii: S1046-2023(15)30092-X.
- KRAMPERA M, GALIPEAU J, SHI Y, TARTE K, SENSEBE L; MSC COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*. 2013 Sep;15(9):1054-61.
- LE PEN C, REYGROBELLET C, GÉRENTES I. Financial cost of osteoarthritis in France. The "COART" France study. *Joint Bone Spine*. 2005 Dec;72(6):567-70.
- LOSFELT Gabrielle. Thèse de Pharmacie : La prise en charge de l'arthrose chez l'Homme et chez le Cheval. *Université de Nantes*, soutenue le 13 décembre 2013.
- MATZAT SJ, KOGAN F, FONG GW, GOLD GE. Imaging strategies for assessing cartilage composition in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2014 Nov;16(11):462.
- MEISEL R, ZIBERT A, LARYEA M, GÖBEL U, DÄUBENER W, DILLOO D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4619-21.
- MERCERON C, VINATIER C, CLOUET J, COLLIEC-JOUAULT S, WEISS P, GUICHEUX J. Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering. *Joint Bone Spine*. 2008 Dec;75(6):672-4.
- MITROVIC D, MANSAT C. Le cartilage, un tissu conjonctif très différencié. *Edition Privat*. 2010.
- NIXON AJ, WATTS AE, SCHNABEL LV. Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *J Shoulder Elbow Surg*. 2012 Feb;21(2):278-94.
- PANAHIFAR A, JAREMKO JL, TESSIER AG, LAMBERT RG, MAKSYMOWYCH WP, FALLONE BG, DOSCHAK MR. Development and reliability of a multi-modality scoring system for evaluation of disease progression in pre-clinical models of osteoarthritis: celecoxib may possess disease-modifying properties. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014 Oct;22(10):1639-50.
- PIEL MJ, KROIN JS, IM HJ. Assessment of knee joint pain in experimental rodent models of osteoarthritis. *Methods Mol Biol*. 2015;1226:175-81.

- PUIG-JUNOY J, RUIZ ZAMORA A. Socio-economic costs of osteoarthritis: a systematic review of cost-of-illness studies.
Semin Arthritis Rheum. 2015 Apr;44(5):531-41.
- REDDYHOFF D, WARD J, WILLIAMS D, REAGAN S, WEBB S. Timescale analysis of a mathematical model of Acetaminophen metabolism and toxicity.
J Theor Biol. 2015 Sep 5. pii: S0022-5193(15)00414-2.
- RICHETTE P. Arthrose.
La Revue du Praticien 2005 ; 55(17) :1933-42.
- RICHETTE P, LATOURTE A, FRAZIER A. Safety and efficacy of paracetamol and NSAIDs in osteoarthritis: which drug to recommend?
Expert Opin Drug Saf. 2015 Aug;14(8):1259-68.
- RUIZ M, COSENZA S, MAUMUS M, JORGENSEN C, NOËL D. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in osteoarthritis.
Expert Opin Biol Ther. 2015 Sep 28;15(9):1-10.
- SHARMA RR, POLLOCK K, HUBEL A, MCKENNA D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices.
Transfusion. 2014 May;54(5):1418-37.
- SMITH A. A glossary for stem-cell biology.
Nature 441, 1060 (29 June 2006).
- TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.
Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- TER HUURNE M, SCHELBERGEN R, BLATTES R, BLOM A, DE MUNTER W, GREVERS LC, JEANSON J, NOËL D, CASTEILLA L, JORGENSEN C, VAN DEN BERG W, VAN LENT PL. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis.
Arthritis Rheum. 2012 Nov;64(11):3604-13.
- VERONESI F, MAGLIO M, TSCHON M, ALDINI NN, FINI M. Adipose-derived mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: state-of-the-art in *in vivo* studies.
J Biomed Mater Res A. 2014 Jul;102(7):2448-66.
- VITAL DURAND D, LE JEUNE C. Guide pratique des médicaments 32^e édition.
DOROSZ, Edition Maloine. 2013.
- ZHANG W, MOSKOWITZ RW, NUKI G, ABRAMSON S, ALTMAN RD, ARDEN N, BIERMA-ZEINSTRAS S, BRANDT KD, CROFT P, DOHERTY M, DOUGADOS M, HOCHBERG M, HUNTER DJ, KWOH K, LOHMANDER LS, TUGWELL P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines.
Osteoarthritis Cartilage. 2008 Feb;16(2):137-62.

REFERENCES INTERNET

Site internet dédié au projet ADIPOA-2, consulté le 12 septembre 2015

<http://adipoa2.eu/>

Site internet de l'Agence de la Biomédecine, consulté le 27 septembre 2015

Brochure d'information destinée aux professionnels de santé sur le don de sang placentaire

http://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/doc_don_placentaire-2.pdf

Site internet de l'EMA (European Medicines Agency), consulté le 30 septembre 2015

Résumé EPAR à l'intention du public concernant Holoclar[®] EMA/6865/2015

http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002450/WC500183406.pdf

Site internet d'EuroStemCell, consulté le 25 septembre 2015

<http://www.eurostemcell.org/fr/factsheet/types-de-cellules-souches-et-leurs-applications#compare>

Site internet de la Haute Autorité de Santé (HAS), consulté le 25 juillet 2015

Focus du 18 mars 2014, Prise en charge de l'arthrose : le paracétamol en première intention lors des crises douloureuses.

http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1725979/fr/prise-en-charge-de-l-arthrose-le-paracetamol-en-premiere-intention-lors-des-crisis-douloureuses

Site internet du LEEM (Les Entreprises du Médicament), consulté le 25 septembre 2015.

Etude Bionest, La Thérapie cellulaire (2010)

http://www.leem.org/sites/default/files/import/presse/dossiers/33_Bionest%2B-%2BLeem%2BTh%25C3%25A9rapie%2BCellulaire%2BRapport%2B-%2B2-2-10%2Benvoi%2BLEEM.pdf

Site internet de l'INSERM, consulté le 24 septembre 2015.

- ① Dossier Cellules souches et thérapie cellulaire, réalisé en collaboration avec les Pr Marc Peschanski et Christian Jorgensen en avril 2015.

<http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/cellules-souches-et-therapie-cellulaire>

- ② SEMINAIRES DE FORMATION KETTY SCHWARTZ. Biothérapie : les thérapies géniques et cellulaires : 2010-2011, en partenariat avec l'Association Française contre les Myopathies.

Site internet du Registre des essais cliniques réalisés dans le monde, consulté le 14 septembre 2015

<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

Site internet de la Société Française de Rhumatologie, consulté le 24 juillet 2015

<http://www.rhumatologie.asso.fr/05-Bibliotheque/Livre-Blanc/C6-epidemiologie.asp>
Livre Blanc chapitre 3, environnement socio-économique et rhumatologie

Site internet de la Société Française de Rhumatologie, consulté le 3 septembre 2015
<http://www.rhumatologie.asso.fr/02-Congres/2008/Nice2008Vendredi.asp>
BERENBAUM F. La physiopathologie de l'arthrose – Cours francophone de rhumatologie.

Sites internet sources des Figures :

<http://www.cellcan.com/en/medecine-regeneratrice.php>, consulté le 27 septembre 2015

www.sciencesetavenir.fr/infographies/20121008.OBS4954/infographie-les-quatre-types-de-cellules-souches.html, consulté le 27 septembre 2015

www.mclef.net/pageweb/d_articulation.htm, consulté le 21 septembre 2015.

<http://archives.coordination-nationale-infirmiere.org/index.php/201004141201/Actualites/Tout-ce-que-vous-avez-toujours-voulu-savoir-sur-l-Acide-Hyarulonique.html>, consulté le 21 septembre 2015.

<http://www.naturalheightgrowth.com/2014/04/14/cyclic-mechanical-shear-compression-induces-progenitor-mesenchymal-stem-cells-towards-chondrogenesis-breakthrough/>, consulté le 21 septembre 2015.

http://www.ims77.com/index.php?option=com_content&view=article&id=111:imagerie-de-larthrose&catid=36:article-for-slideshow&Itemid=242, consulté le 21 septembre 2015.

SERMENT DE GALIEN

~~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

## RÉSUMÉ

---

La dégénérescence du cartilage ainsi que le caractère inflammatoire sont les principales caractéristiques de l'arthrose. Cette pathologie dégénérative est la plus fréquente. Elle atteint les sujets âgés comme les plus jeunes, mais aussi les sujets obèses comme les plus sportifs. Les étiologies et facteurs de risques sont nombreux. Dans le contexte sociétal et démographique actuel et envisagé, l'arthrose est un véritable problème de santé publique. De plus les traitements disponibles n'offrent qu'une correction symptomatique, donc cette pathologie présente aussi un enjeu scientifique et médical.

La thérapie cellulaire, Biothérapie en large expansion et outil en Médecine régénérative, marque un changement dans les stratégies thérapeutiques. Son objectif est de dépasser les limites imposées par les traitements pharmaco-chimiques, ceci en utilisant des types cellulaires très variés. Les plus étudiés sont les cellules souches pluripotentes (embryonnaires, ou induites) et les cellules souches mésenchymateuses (multipotentes). Ces dernières ont été identifiées dans de nombreux organes et possèdent des fonctions particulièrement intéressantes, comme leur capacité de différenciation ou encore leur pouvoir anti-inflammatoire et immuno-modulateur. L'intérêt de la communauté scientifique pour ces stratégies grandissant depuis plusieurs décennies aboutit aux premiers essais cliniques. Les domaines de l'ophtalmologie de la cardiologie et de la rhumatologie sont les principales cibles.

Une start-up, STEM CIS, dont l'activité se concentre sur le développement de dispositifs médicaux soit dans le domaine de la chirurgie esthétique (Adip'Sculpt), soit dans le domaine vétérinaire (Scivet), souhaite s'étendre à la médecine régénérative *via* la thérapie cellulaire à partir du tissu adipeux. Une étude préclinique est réalisée sur un modèle chirurgical d'arthrose chez le rat. Il s'agit d'étudier l'effet de différentes conditions d'injection de cellules extraites à partir de lipoaspiration, les cellules de la fraction stromale vasculaire. Une semaine après l'induction du modèle chirurgical des deux genoux, les cellules placées dans différentes conditions sont injectées en intra-articulaire. Trois mois après l'induction, les analyses micro-CT et histologiques révéleront l'état clinique des articulations. Les premiers résultats semblent souligner la nécessité d'une séparation en quatre régions articulaires mais aussi une potentielle action synergique de l'association des cellules avec un bio-polymère. D'autres études ultérieures doivent être menées, dans le but de soutenir un essai clinique, et *in fine* développer un kit à usage unique pour le traitement de l'arthrose de façon autologue, mais aussi pour clarifier le rôle (bénéfique ?) de la fraction stromale vasculaire complète.

**Mots clés :** Thérapie cellulaire – arthrose – préclinique – intra-articulaire – fraction stromale vasculaire