

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

# **Rôle de la voie L-PGDS / PGD2 / DP1 dans l'ostéoarthrose**

par

Yassine OUHADDI

Programme des sciences biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de PhD  
en Sciences Biomédicales  
option Médecine expérimentale

Avril, 2019

© Yassine Ouhaddi, 2019.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

Rôle de la voie L-PGDS / PGD2 / DP1  
dans l'ostéoarthrose

Présentée par :

Yassine OUHADDI

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Francis Rodier, président-rapporteur  
Dr Hassan Fahmi, directeur de recherche  
Dr Mohamed Benderdour, co-directeur  
Dr Guy Rousseau, membre du jury  
Dr Abdelaziz Amrani, examinateur externe  
Dr Casimiro Gerarduzzi, représentant du doyen de la FES



## RÉSUMÉ

L'arthrose (OA) est la maladie dégénérative la plus fréquente (ou) et la principale cause d'incapacité physique avec un coût socioéconomique important. Les manifestations cliniques de l'arthrose peuvent inclure des douleurs, des raideurs et des mouvements articulaires réduits. Pathologiquement, l'OA se caractérise par une dégénérescence progressive du cartilage articulaire, une augmentation de l'expression des médiateurs inflammatoires et cataboliques et le remodelage osseux sous-chondral.

Il a été démontré que la protéine prostaglandine D2 (PGD<sub>2</sub>) est synthétisée par différents types cellulaires et possède des propriétés pro et anti-inflammatoires, selon le récepteur activé. Plusieurs stimuli pro-inflammatoires ont été discernés et étudiés, mais par contre, les voies anti-inflammatoires restent toujours un univers inexploré. Le récepteur DP1 de la PGD<sub>2</sub>, ainsi que l'enzyme de synthèse L-PGDS, jouent des rôles importants dans l'inflammation et le métabolisme du cartilage. Cependant, leurs rôles dans la pathogenèse de l'arthrose (OA) restent inconnus.

Nous avons entrepris l'étude (de quoi) d'une part, pour explorer les rôles de la L-PGDS et de DP1 dans le développement d'OA, et d'autre part pour évaluer l'efficacité d'un agoniste sélectif de DP1 et d'un virus d'AAV2 / 5 codant pour L-PGDS dans le traitement de l'OA. En premier, nos travaux par histologie ont démontré que la dégradation du cartilage est plus prononcée chez les souris Knock-out L-PGDS et DP1, comparativement au souris sauvages Wild-Type (WT). Ensuite une augmentation de l'expression des médiateurs cataboliques (ADAMTS5 et MMP-13), chez les souris L-PGDS <sup>-/-</sup> et DP1 <sup>-/-</sup> par rapport au WT a été démontré. Après, la stimulation des explants de cartilage des souris L-PGDS <sup>-/-</sup> et de DP1 <sup>-/-</sup> avec l'IL-1 $\alpha$ , ont montré une dégradation élevée en protéoglycanes. En outre ces souris ont développer aussi des modifications osseuses sous-chondral. Enfin, nos résultats suggèrent qu'à la suite d'injection intrapéritonéale de l'agoniste spécifique de DP1, le BW245C a atténué la gravité de la dégradation du cartilage induite par une déstabilisation du ménisque médiale (DMM) et des modifications osseuses

chez les souris WT. Pareillement, l'injection intra-auriculaire d'AAV2 / 5 codant pour L-PGDS a atténué aussi la dégradation du cartilage induite par DMM et l'expression de ADAMTS-5 et MMP-13 chez des souris L-PGDS -/-.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggèrent que le récepteur DP1 et l'enzyme L-PGDS au niveau du cartilage articulaire arthrosique joue un rôle très important. Elle pourrait constituer une voie thérapeutique potentielle dans le traitement de l'OA et aussi dans le traitement d'autres pathologies musculo-squelettiques.

**Mots-clés** : Arthrose, cartilage, L-PGDS, PGD2, DP1, chondrocytes

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative disease (or) and the leading cause of physical disability with significant socioeconomic costs. Clinical manifestations of osteoarthritis can include pain, stiffness, and reduced joint movement. Pathologically, OA is characterized by progressive degeneration of articular cartilage, increased expression of inflammatory and catabolic mediators, and subchondral bone remodeling.

It has been shown that prostaglandin D2 protein (PGD<sub>2</sub>) is synthesized by different cell types and has pro and anti-inflammatory properties, depending on the activated receptor. Several pro-inflammatory stimuli have been discerned and studied, but the anti-inflammatory pathways remain an unexplored universe. The DP1 receptor of PGD<sub>2</sub>, as well as the synthetic enzyme L-PGDS, play important roles in inflammation and cartilage metabolism. However, their roles in the pathogenesis of osteoarthritis (OA) remain unknown.

We undertook the study (of what) on the one hand, to explore the roles of L-PGDS and DP1 in the development of OA, and on the other hand to evaluate the efficacy of a selective agonist DP1 and an AAV2 / 5 virus encoding L-PGDS in the treatment of OA. First, our histology work demonstrated that cartilage degradation is more pronounced in L-PGDS Knock-out and DP1 mice compared to Wild-Type (WT) wild-type mice. Then an increase in the expression of catabolic mediators (ADAMTS5 and MMP-13), in L-PGDS - / - mice and DP1 - / - compared to WT was demonstrated. Subsequently, stimulation of cartilage explants with IL- $\alpha$  from L-PGDS - / - and DP1 - / - mice showed high degradation in proteoglycans. In addition, these mice also develop subchondral bone changes. Finally, our results suggest that following intraperitoneal injection of the DP1-specific agonist, BW245C attenuated the severity of cartilage degradation induced by medial meniscus destabilization (DMM) and bone changes in mice. WT. Similarly, the intra-atrial injection of AAV2 / 5 encoding L-PGDS also attenuated DMM-induced cartilage degradation and the expression of ADAMTS-5 and MMP-13 in L-PGDS - / - mice.

In conclusion, all our results suggest that the recepteur DP1 and the L-PGDS enzyme in osteorthritis cartilage plays a very important role.. It may be a potential therapeutic avenue in the treatment of OA and also in the treatment of other musculoskeletal conditions.

**Keywords:** Osteoarthritis, cartilage, L-PGDS, PGD2, DP1, chondrocytes

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	3
ABSTRACT .....	5
LISTE DES FIGURES : .....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
REMERCIEMENTS.....	14
CHAPITRE A : REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	15
1. Généralité sur l'arthrose .....	15
2. Épidémiologie de l'arthrose.....	16
3. Symptôme et diagnostic.....	17
4. Facteur de risques .....	18
4.1 Âge .....	18
4.2 Sénescence cellulaire.....	19
4.3 Génétique .....	20
4.4 Sexe .....	21
4.5 Obésité.....	22
4.6 Ethnicité .....	23
5. Structure du genou.....	23
5.1 Structure et composition du cartilage articulaire.....	24
5.1.1 Chondrocytes .....	27
5.1.2 Matrice extracellulaire .....	27
5.1.3 Eau .....	29
5.1.4 Collagène .....	30
5.1.5 Protéoglycanes.....	31
5.1.6 Autres protéines non collagènes .....	31
5.2 La nutrition du cartilage articulaire .....	32
5.3 Membrane synoviale .....	32
5.4 Os sous-chondral .....	33
6. Physiopathologie de l'arthrose .....	34
6.1 Cartilage .....	35
6.2 Os .....	37
6.3 Membrane synoviale .....	38
6.4 Ménisques et ligaments .....	38
7. Les médiateurs et facteurs impliqués dans l'arthrose .....	39

7.1	Facteurs cataboliques .....	39
7.1.1	MMPs .....	39
7.1.2	ADAMTS .....	42
7.2	Facteurs anaboliques .....	43
7.2.1	TGF- $\beta$ .....	44
7.2.2	BMP .....	44
7.2.3	IGF-1 .....	45
7.3	Médiateurs pro-inflammatoires .....	46
7.3.1	Cytokine : .....	46
7.3.2	Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).....	54
7.3.3	Les prostaglandines .....	59
8.	Traitement actuel de l'arthrose et ses limites .....	65
8.1	Intervention chirurgicale pour traiter l'arthrose.....	68
8.2	Thérapie cellulaire et médecine régénératrice pour l'arthrose.....	69
	CHAPITRE B : TRAVAUX RÉALISÉS .....	71
	Article 1 .....	73
	Article 2 .....	108
	CHAPITRE C : .....	141
	DISCUSSION .....	141
	CONCLUSION .....	156
	BIBIIOGRAPHIE .....	158

## LISTE DES FIGURES :

### CHAPITRE A :

Figure 1: Caractéristiques pathogènes de l'arthrose (défaillance articulaire) .....	16
Figure 2: Schéma représentatif de l'anatomie d'un genou. ....	24
Figure 3: Illustration schématique de la composition et de la structure du cartilage articulaire tapissant l'os. ....	25
Figure 4: Matrice extracellulaire du cartilage articulaire.....	29
Figure 5: Voies de signalisation et des changements structurels dans le développement de l'arthrose.....	35
Figure 6: Voies de signalisation intracellulaires associées à l'IL-1 $\beta$ et cibles et effets cellulaires en aval.....	49
Figure 7: Production d'espèces réactives de l'oxygène impliquées dans la pathogenèse de l'arthrose. ....	54
Figure 8: Mécanismes liés au stress oxydatif de la pathogenèse de l'arthrose. ....	57
Figure 9: Synthèse et actions des prostaglandines.....	60
Figure 10: Rôle de la prostaglandine (PG) E2 dans le processus d'arthrose.....	62
Figure 11: Modalités de traitement actuellement recommandées pour l'arthrose.....	66
Figure 12: Représentation schématique de l'effet de 15d-PGJ2. ....	153

### CHAPITRE B:

#### ARTICLE 1:

Figure 1: Accelerated cartilage erosion in D prostanoid receptor 1-deficient (DP1 $^{-/-}$ ) mice with age.....	97
Figure 2: Accelerated progression of OA in DP1 $^{-/-}$ mice following destabilization of the medial meniscus (DMM) surgery.....	98
Figure 3: Expression of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) and ADAMTS-5 in the knee joints of WT and DP1 $^{-/-}$ mice at ages 3 months and 9 months.....	99
Figure 4: Micro-computed tomography (micro-CT) analysis of the subchondral bone of the tibial plateau of WT and DP1 $^{-/-}$ mice at ages 3 months and 15 months.....	100
Figure 5: Deletion of DP1 enhances interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )-induced proteoglycan degradation in conditioned medium from cultured knee cartilage explants.....	101
Figure 6: Treatment with the DP1 agonist BW245C (BW) reduces the severity of OA in the destabilization of the medial meniscus (DMM) model.....	102
Supplemental Figure 1. Expression of MMP-13 and ADAMTS-5 in the knee joints of WT and DP1 $^{-/-}$ mice at 2 weeks post-surgery.....	106

Supplemental Figure 2. Micro-CT analysis of the subchondral bone of the tibial plateau of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at 8 weeks post-DMM surgery.....107

**ARTICLE 2:**

Figure 1: L-PGDS deletion exacerbated OA following DMM surgery.....130  
Figure 2: Expression of ADAMTS-5, and MMP-13 in the knee joints of WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 2 weeks post-DMM surgery.....131  
Figure 3: L-PGDS deletion enhanced IL-1 $\alpha$ -induced proteoglycan degradation in cultured cartilage explants.....132  
Figure 4: Micro-CT analysis of the subchondral bone of the tibial plateau of WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 8 weeks post-DMM surgery.....133  
Figure 5: AAV2/5-mediated L-PGDS expression in the joint attenuated DMM-induced OA progression in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice.....134  
Figure 6: Increased expression of L-PGDS in mouse OA cartilage.....138  
Supplemental Figure 1. Effective deletion of L-PGDS in L-PGDS<sup>-/-</sup> chondrocytes.....139  
Supplemental Figure 2. Expression of C1, 2C, NITEG and VDIPEN in the knee joints of WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 2 weeks post-DMM surgery.....140



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACL	Ligament croisé antérieur
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ADAMTs	disintegrin and a metalloprotease with thrombospondin motifs
ADAM	Disintegrin and a metalloprotease
AA	Acide arachidonique
AP-1	Activator protein 1
AR	Arthrite rhumatoïde
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
BMPs	Protéines osseuses morphogénétiques
BMD	Densité minérale osseuse
CAMK	Ca <sup>2+</sup> / calmodulin-dependent protein kinase
COX	Cyclo-oxygénase
CRTH2	Récepteur chimiotactique exprimée sur Th2
DP1	Récepteur D prostanöide
DBD	Domaine de fixation à l'ADN
DAG	Diacyl glycérol
DMM	Déstabilisation du ménisque médial
EP	Récepteur de la PGE <sub>2</sub>
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
H-PGDS	Prostaglandine D synthase hématopoïétique
IL	Interleukine
IL-1R	Récepteurs de l'interleukine 1
IL-1Ra	Antagoniste du récepteur de l'IL-1 $\beta$
ICE	Enzyme de conversion de l'IL-1 $\beta$
IGFs	Insulin-like growth factor
IGFBD	IGF binding proteins
IKKB	kinase de la famille d'IKK
IKK	IkappaB kinase complex
IMC	Indice de masse corporelle
IP	Récepteur de la prostacycline
IP3	Inositol 2,4,5 triphosphate
IRM	Imagerie par résonance magnétique
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LBD	Domaine de liaison au ligand
L-PGDS	Prostaglandine D synthase de type lipocaline
MAP	kinases Mitogen-activated protein kinases
MEK	MAPK/ERK kinase
MEKK1	Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase
Micro CT	Microtomographie aux rayons X
MMPs	Métalloprotéases matricielles
mPGES-1	Microsomal PGE synthase-1

NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
OA	Arthrose
PGs	Prostaglandines
PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
PPAR $\gamma$	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma
PPRE	Peroxisome proliferator-activated receptor response elements
PKC	Protéine kinase C
PKA	Protéine kinase A
PLA <sub>2c</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> cytosolique
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate
PGES	PGE synthase
PLC	Phospholipase C
p38MAPK	p38 Mitogen-activated protein kinases
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Sp1	Specificity protein 1
SRE	Éléments de réponse au sérum
SRF	Facteur de réponse au sérum
sIL-6R	Récepteur soluble de l'IL6
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformants béta
TIMPs	Inhibiteurs des métalloprotéinases
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale alpha
TNF-R	Récepteur du facteur de nécrose tumorale
TX	Thromboxane
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
3D	Trois dimensions
$\delta$ 12-PGJ <sub>2</sub>	Delta-12-prostaglandine J <sub>2</sub>
15d-PGJ <sub>2</sub>	15-déoxy-D-12,14-prostaglandine J <sub>2</sub>

*Je dédie cette thèse :*

*À mes parents,*

*Pour votre soutien tout au long de mon parcours scolaire,*

*À mes frères et mes cousins,*

*Pour votre soutien et vos encouragements constants,*

*À ma Tante Fatima,*

*Pour ton aide et pour ton soutien précieux*

*À toute ma famille,*

*À tous mes amis.*

## REMERCIEMENTS

Premièrement et avant tout, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour continuer, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés. Je voudrais aussi exprimer ma sincère gratitude à mon directeur de recherche, le Dr Hassan Fahmi, de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour réaliser cette thèse. Je le remercie également pour ses conseils, son assistance et ses encouragements.

Je remercie sincèrement le Dr Mohamed Benderdour, mon codirecteur, pour ses précieuses suggestions, son aide et ses conseils.

J'aimerais également remercier les docteurs Johanne Martel-Pelletier et Jean-Pierre Pelletier, directeurs de l'Unité de recherche sur l'arthrose du centre de recherche CHUM, de leur soutien et de leur aide. Mes remerciements s'adressent également aux membres de jury, Dr, Francis Rodier, Dr, Guy Rousseau, Dr, Abdelaziz Amrani et Dr, Casimiro Gerarduzzi, qui ont accepté de passer en revue ces travaux. Je suis profondément reconnaissant à H. Afif, associé de recherche, dont les conseils constants m'ont aidé à apporter les améliorations nécessaires au cours de ce travail. Merci également à tous les étudiants de notre laboratoire.

Un merci spécial à tous les membres de l'unité de d'arthrose pour leur aide, leur gentillesse et leur amitié.

Enfin, je voudrais exprimer mes remerciements à la Société de l'arthrite du Canada, aux Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), au Fonds de recherche du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) et à l'université de Montréal, pour le financement, les prix et les bourses.

# CHAPITRE A : REVUE DE LA LITTÉRATURE

## 1. Généralité sur l'arthrose

L'arthrose (OA) est la maladie la plus fréquente des maladies articulaires. Elle touche 10 à 20 % des personnes de plus de 50 ans. L'incidence de l'arthrose devrait doubler au cours des 30 prochaines années (1). La maladie se caractérise par une dégénérescence progressive du cartilage, la sclérose sous-chondral et l'inflammation synoviale, ainsi que des dommages à d'autres structures articulaires, comme les ligaments et les ménisques, causant de la douleur et une perte de la fonction articulaire, de l'instabilité et un handicap physique, nuisant à la qualité de vie (Figure 1) (2).

Les articulations les plus souvent touchées sont les hanches, les genoux et les articulations des doigts, bien que le cou (colonne cervicale) et le bas du dos (colonne vertébrale) peuvent également être atteints. À l'heure actuelle, il n'y a aucun traitement prouvé pouvant arrêter la progression de la maladie. Donc la seule solution qui reste pour les patients OA est le remplacement de l'articulation de la hanche ou du genou (2).

L'arthrose est un système complexe de boucles de rétroaction mécaniques, biologiques, biochimiques, moléculaires et enzymatiques en interaction (2). La voie commune finale est la destruction des tissus articulaires résultant de l'incapacité des cellules à maintenir un équilibre homéostatique entre la synthèse et la dégradation matricielle. Au fur et à mesure que la maladie progresse, le processus de dégradation dépasse éventuellement le processus de synthèse, conduisant à des lésions progressives du tissu articulaire. Cela semble se produire lorsque l'équilibre physiologique entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire favorise le catabolisme (2, 3).

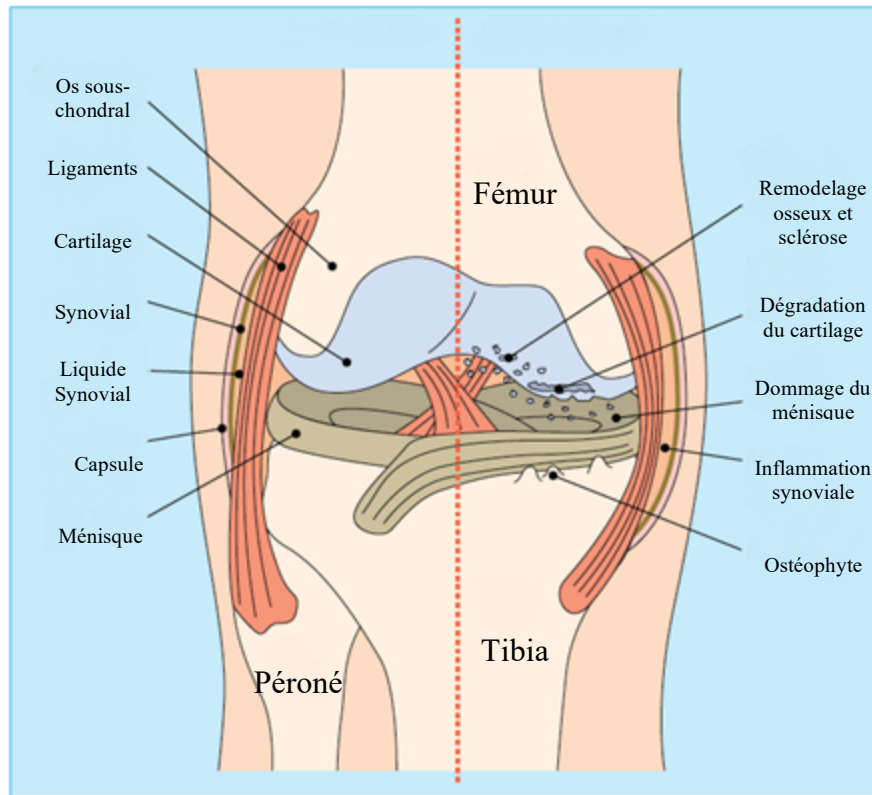


Figure 1: Caractéristiques pathogènes de l'arthrose (défaillance articulaire)

L'arthrose est une maladie de toute l'articulation dont les changements pathologiques se produisent dans tous les tissus articulaires. Comme indiqué, dans le cartilage sain (normal), il n'y a pas de dégradation, pas de signe d'inflammation synoviale ni de remodelage osseux. Cependant, dans l'arthrose, le cartilage est dégénéré avec lésions et fibrillation. Ceci est accompagné d'une inflammation synoviale, d'une fibrose de la capsule et d'un remodelage osseux conduisant à une excroissance osseuse et à une sclérose sous-chondral (Adapté de la référence : 4) (Autorisation demandée).

## 2. Épidémiologie de l'arthrose

Au Canada, l'arthrose affecte environ 4,4 millions de personnes (5). À l'échelle mondiale, l'arthrose est la maladie articulaire la plus répandue (6) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 10 % de la population mondiale souffre de problèmes cliniques attribués à l'arthrose (7). En raison de la longévité accrue, de la réduction des niveaux d'activité physique et de la prévalence croissante de l'obésité, le

fardeau de l'arthrose augmente (5, 8). On prévoit que, d'ici 2040, plus de 10 millions de Canadiens recevront un diagnostic d'arthrose (5).

Les estimations de la prévalence et de l'incidence de l'arthrose diffèrent largement en raison des différences dans la définition des cas et les articulations considérées (9, 10). En général, chez les adultes de 65 ans, l'arthrose des mains est rapportée dans environ 60 % des cas, alors que celle du genou et de la hanche est de 33 % et 5 %, mais la plupart des cas se trouvent surtout en Amérique du Nord et en Europe (11, 12). La maladie est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, âgés plus de 50 ans. L'écart entre les sexes étant le plus prononcé pour l'arthrose des mains et des genoux. Les taux de prévalence augmentent fortement avec l'âge chez les deux sexes. Bien que la distribution d'OA soit mondiale, on constate des différences de prévalence géographiques et ethniques. Les données européennes et américaines ne diffèrent pas significativement pour les maladies des mains, des genoux et des hanches. Cependant, l'arthrose des mains est moins fréquente dans les populations amérindiennes et afro-américaines que dans la population américaine Caucasienne (9, 13). En revanche, l'arthrose de la hanche est faible dans les populations du Sud-est asiatique et orientale, ce qui est attribuable, en partie, à des modifications de la morphologie pelvienne (9).

L'arthrose est classée en deux groupes : l'arthrose primaire et secondaire. L'arthrose primaire, appelée aussi arthrose idiopathique, est la forme d'arthrose la plus courante. Elle est classée comme primaire lorsque la personne atteinte d'arthrose n'a pas de prédisposition évidente (14). L'arthrose primaire est une maladie frustrante, car sa cause et son traitement sont inconnus effectivement, mais nous avons quelques pistes. L'arthrose est secondaire lorsqu'elle est associée à une pathologie définie, comme des troubles du développement, des traumatismes ou des maladies métaboliques (14, 15).

### **3. Symptôme et diagnostic**

Le diagnostic de l'arthrose est généralement posé cliniquement, puis confirmé par radiographie. Les principaux symptômes suggérant ce diagnostic d'arthrose comprennent : **la douleur** qui est généralement décrite comme liée à l'activité et soulagée par le repos, qui peut survenir au repos dans une maladie avancée. **La réduction de la fonction**

**articulaire, la raideur** (de courte durée et est également appelée « gélification », c'est-à-dire une raideur de courte durée après une période d'inactivité), et **l'instabilité articulaire**. Les patients peuvent également se plaindre de mouvements réduits, de déformations, d'enflures, de crépitations et d'un âge avancé (l'arthrose est inhabituelle avant l'âge de 40 ans) (16).

Au cours d'une période d'un an, un quart des personnes âgées de > 55 ans ont des douleurs persistantes au genou, dont environ un sur six consulte leur médecin généraliste à ce sujet (17). Pour environ la moitié d'entre eux, on détecte une arthrose du genou par radiographie.

La perte de cartilage ne contribue probablement pas directement à la douleur, car elle est dépourvue de nerfs. En revanche, l'os sous chondral, le périoste, la synoviale et la capsule articulaire sont tous richement innervés et pourraient être à l'origine de stimuli nociceptifs dans l'arthrose (4).

## **4. Facteur de risques**

L'étiologie de l'arthrose reste à comprendre, mais l'évolution de la dégénérescence articulaire est reconnue pour être variable. Bien que certains facteurs de risque soient les mêmes pour les hommes que les femmes, comme l'âge, la génétique, les traumatismes, le déséquilibre du genou et l'obésité. .. D'autres risques sont différentiels, selon le sexe et l'état des tissus articulaires. Par exemple, une densité osseuse plus élevée est associée à une incidence accrue d'arthrose radiographique du genou chez la femme (2), mais cette relation n'a pas été observée de la même manière chez les hommes ni pour l'arthrose des mains (18, 19).

### **4.1 Âge**

L'âge est le principal facteur de risques de la maladie de l'arthrose et son incidence augmente avec elle (20, 21). Cependant, les personnes âgées ne sont pas toutes atteintes d'arthrose (20). On pense généralement que les changements normaux dus au vieillissement augmentent la susceptibilité à l'arthrose, mais des facteurs de risques supplémentaires sont nécessaires au développement de l'arthrose symptomatique ou clinique (20). Les lésions



radiographiques au genou augmentent également avec l'âge, même en l'absence de maladie, ce qui montre qu'une dégradation légère des articulations peut survenir et s'accumuler avec le vieillissement (20, 22). Il est presque impossible de distinguer si ces changements radiographiques font partie du vieillissement normal ou de l'arthrose préclinique non encore développée. Le vieillissement diminue également la capacité de l'articulation à réagir aux facteurs de stress et à maintenir l'homéostasie dans le cartilage, comme le montre le fait que les personnes âgées développent l'arthrose plus rapidement que les adultes plus jeunes à la suite de blessures similaires (20, 23).

Les changements cellulaires qui surviennent avec le vieillissement peuvent également augmenter la sensibilité à l'arthrose. Comme il y a peu ou pas de division cellulaire ou de mort cellulaire dans le cartilage adulte, les chondrocytes peuvent accumuler des changements liés à l'âge au fil du temps (24). L'accumulation de produits finis de glycation avancée (AGE) peut augmenter la réticulation du collagène, rendant le cartilage plus fragile (24). Il a également été démontré que les chondrocytes âgés présentent un phénotype de sécrétion associé à la sénescence, lequel inclut une production accrue de cytokines, de chimiokines et de métalloprotéinases (MMP) pouvant contribuer à la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage (24, 25).

#### **4.2 Sénescence cellulaire**

Comme décrit précédemment, l'arthrose est une maladie dégénérative. Bien que plusieurs études confirment la forte corrélation entre l'âge et l'arthrose, le mécanisme responsable de la pathologie n'a toujours pas été identifié de manière définitive. Cette corrélation dépend probablement de certaines modifications de la structure normale des articulations affectant les chondrocytes et la matrice extracellulaire, entraînant une diminution de la capacité de l'articulation à s'adapter à différentes agressions, tant chimiques que mécaniques (26).

Les chondrocytes ont un nombre limité de réplifications autorisées au cours de leur vie (environ 30 à 40 divisions). Ce nombre de réplification est également appelé limite Hayflick (27). Ce phénomène se produit vers la fin de la progression du cycle cellulaire. De nombreuses hypothèses suggèrent que pendant chaque division cellulaire, un fragment de

la structure normale du chromosome est perdue. Cette partie, qui provient d'une structure du même chromosome appelée télomère, devient plus courte après chaque cycle cellulaire. Ce mécanisme protège les séquences codées par l'ADN et empêche, par conséquent, la perte du code génétique. De plus, la longueur du télomère pourrait être utilisée comme marqueur de la sénescence répliquative (28), permettant aux chercheurs d'évaluer le nombre de cycles cellulaires restants.

Il est communément admis que la sénescence de la chondrocyte est le principal facteur responsable du développement et de la progression de l'arthrose, car les cellules sénescées perdent leur capacité à entretenir et à réparer la matrice extracellulaire (MEC) du cartilage (29).

### **4.3 Génétique**

Un certain nombre d'études ont rapporté la présence de plus de 80 mutations des gènes impliqués dans la pathogenèse de l'arthrose (30), parmi lesquelles la plus importante est le polymorphisme d'un seul nucléotide. Celui-ci, appelé rs143383 et situé dans la région non traduite en 3' (3'UTR) du gène du facteur de croissance et de différenciation (GDF5) (31), est responsable du développement, de la maintenance et de la réparation des articulations synoviales (32). Les gènes des récepteurs de la vitamine D (VDR) et du facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF-1) semblent également être impliqués dans les voies physiopathologiques de l'arthrose (33). Le premier, dont le locus est localisé près de celui du collagène de type II, contrôle la densité osseuse (33).

Récemment, l'étude d'association pangénomique (Genome-Wide Association Study GWAS) a également mis en évidence une corrélation entre l'arthrose de la main et la diminution de l'expression d'ALDH1A2, un gène de la famille des aldéhydes déshydrogénases 1 (34). Le terme épigénétique désigne tous les changements héréditaires qui se produisent dans les phénotypes sans aucune modification dans les génotypes, donc dans la séquence d'ADN primaire. Contrairement aux modifications génétiques, les méthodes épigénétiques sont plus rapides et les cellules les utilisent comme réponse aux changements de leur microenvironnement. Les profils épigénétiques, médiés par la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones et les ARN non codants, répondent aux

stimuli externes, à la prolifération et à la différenciation cellulaires (31). Ces modifications permettent de moduler l'expression de certains gènes en introduisant une susceptibilité génétique (31).

Les altérations les plus évidentes qui semblent être sous régulation épigénétique sont celles des promoteurs MMP-13 et IL-1  $\beta$ . La MMP-13 est une enzyme impliquée dans la destruction de la matrice cartilagineuse dans l'arthrose. Des études récentes démontrent que cette altération dépend d'une déméthylation des sites CpG dans le promoteur de la MMP-13 (35). Dans les chondrocytes humaines, trois altérations différentes sont associées à une augmentation des niveaux d'expression du gène de la MMP-13 : un site situé à -104, -110 et -299 pb (36). Une autre étude montre des sites similaires dans le promoteur de l'IL-1  $\beta$ .

Il semble également intéressant de noter que l'arthrose ne présente pas de locus à fort impact, mais un mélange de différents gènes exprimant des protéines jouant un rôle dans la manifestation d'OA.

#### **4.4 Sexe**

La prévalence de l'arthrose est similaire dans les deux sexes jusqu'à l'âge de 50 ans, après elle augmente considérablement chez les femmes (37, 38, 39). Non seulement les femmes diagnostiquées avec l'arthrose sont plus souvent atteintes, mais elles souffrent généralement de douleurs et d'incapacités plus graves que les hommes (40, 41, 42, 43, 44, 45).

Des études précliniques ont montré qu'il existait une relation complexe et encore mal comprise entre le métabolisme du cartilage et les hormones stéroïdes gonadiques en circulation (46). Les récepteurs aux œstrogènes sont présents sur les chondrocytes humains et animaux et il a été démontré que l'œstrogène avait un rôle chondroprotecteur par son effet sur les facteurs de croissance, les cytokines, les MMP et les ROS (47). Bien qu'il soit possible que les changements dans les niveaux d'œstrogènes puissent expliquer l'augmentation du risque d'arthrose chez les femmes, il s'agit d'une relation complexe qui n'a pas encore été complètement élucidée.

Plusieurs études ont montré que les hommes avaient un volume et une épaisseur de cartilage plus importants et une zone cartilagineuse sous-chondrale plus grande que les femmes après contrôle de l'IMC (39, 48). Cette relation a également été trouvée chez les enfants. Dans une étude portant sur des enfants âgés de 9 à 18 ans (n = 92), les garçons avaient une épaisseur et un volume de cartilage supérieurs à ceux des filles, après prise en compte du poids corporel, de la taille de l'os et de l'activité physique (49). Il existait une association significative entre l'augmentation du volume du cartilage et l'activité vigoureuse pendant plus de 20 minutes. Il a donc été suggéré qu'une augmentation de l'activité physique chez les jeunes garçons pourrait expliquer les différences de cartilage (49). Ces différences de cartilage entre les sexes peuvent jouer un rôle dans l'initiation de l'arthrose du genou, mais des recherches supplémentaires dans ce domaine sont nécessaires.

#### **4.5 Obésité**

L'obésité est un facteur de risque bien établi dans le développement de l'arthrose (43, 50, 51, 52, 53, 54). L'obésité peut entraîner une demande mécanique excessive et une charge et des forces accrues sur l'articulation du genou, ce qui peut directement endommager le cartilage articulaire (24, 55). Cela a été démontré dans des études sur des animaux où des charges anormales dues à l'obésité entraînent des modifications de la composition, de la structure, du métabolisme et des propriétés mécaniques du cartilage (56, 57).

En outre, chez les adultes obèses, une démarche plus lente avec des pas courts et larges et des articulations altérées peuvent contribuer au risque d'arthrose. Cependant, le rôle spécifique de tels changements en termes d'arthrose n'est pas entièrement compris (57, 58).

Les personnes obèses présentent également un risque élevé d'arthrose des mains, ce qui indique que la relation entre l'obésité et l'arthrose n'est pas uniquement mécanique (59). Le tissu adipeux est une source d'inflammation locale et systémique et il a également été démontré qu'un certain nombre d'adipokines associées à l'obésité (IL-6, IL-1, TNF $\alpha$ ) influent sur la biologie du cartilage (59, 60). En outre, l'hypertension,

l'hypercholestérolémie et une glycémie élevée sont associées à une arthrose du genou, indépendante de l'IMC, ce qui indique qu'un ensemble commun de facteurs métaboliques est impliqué dans ces maladies (60, 61, 62). L'obésité est l'un des principaux facteurs de risque de l'arthrose du genou, et il est clairement établi que des facteurs biomécaniques et métaboliques contribuent à l'initiation et à la progression de la maladie.

#### **4.6 Ethnicité**

Les études sur l'arthrose sont en conflit avec la corrélation entre l'ethnicité et l'arthrose. Certaines études de l'Enquête nationale sur la santé et la nutrition dans l'enquête I (NHANES I) suggèrent que les femmes afro-américaines sont plus susceptibles de développer une arthrose du genou que les hommes, surtout les personnes de race blanche (33), alors que le projet du comté de Johnston contre l'arthrose (JCOAP) pour les différences ethniques (63, 64) montre des résultats tout à fait opposés dans l'arthrose de la hanche. Là où NHANES n'a pas révélé de différences (65), le JCOAP l'a fait (66). Cela dépend probablement du style de vie, des facteurs socio-économiques, de l'indice de masse corporelle ou même de facteurs génétiques (67).

### **5. Structure du genou**

L'articulation du genou est une articulation synoviale du type à charnière qui permet principalement la flexion et l'extension (et un faible degré de rotation médiale et latérale) de la jambe. Le genou est formé d'articulations entre la rotule, le fémur et le tibia. – Ils sont tous recouverts d'une couche lisse de cartilage (voir ci-dessous) là où ils se touchent au niveau de l'articulation du genou.

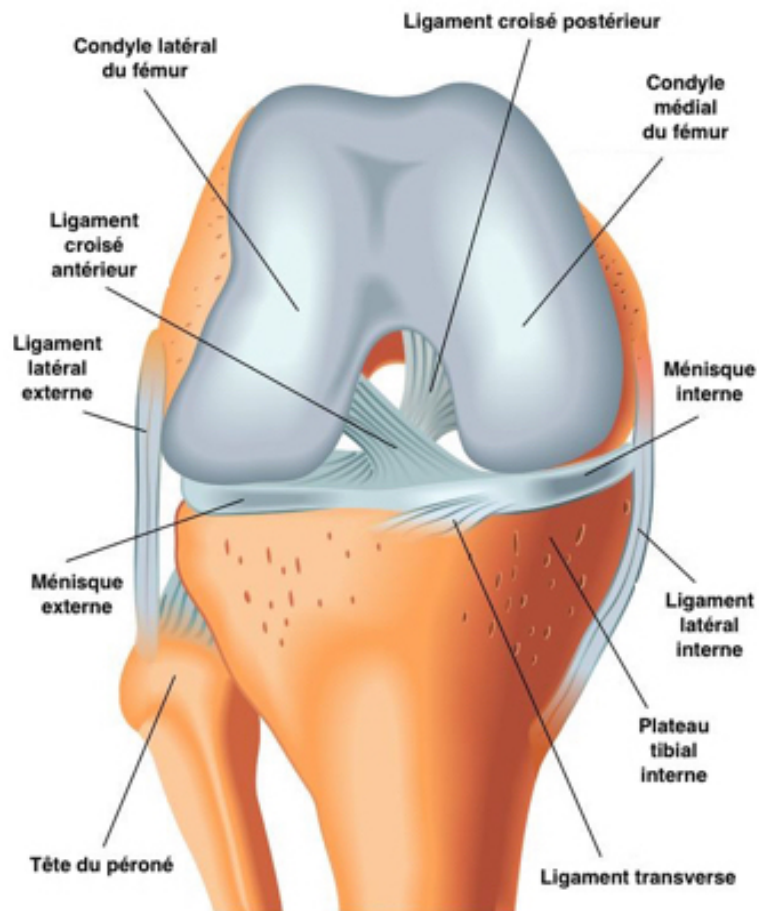


Figure 2: Schéma représentatif de l'anatomie d'un genou.

### 5.1 Structure et composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif, qui protège des frictions et du frottement des surfaces osseuses de toutes les articulations synoviales. Cette couche blanche mince et translucide est d'une épaisseur d'environ 0,5 à 7 mm (68). C'est un tissu dépourvu de vaisseaux et de nerfs. Les composants et les constitutions du cartilage, lui permet de résister aux pressions et aux forces qui subit chaque jour. Sa composition et sa constitution lui permettent de résister à la pression et aux forces qu'il subit chaque jour (69). Par contre, il possède un très faible potentiel de régénération une fois arrivé à maturation (70). Ses fonctions sont assurées par l'eau, la matrice extracellulaire et les chondrocytes.

Le cartilage articulaire est divisé en quatre zones différentes, chacune ayant une composition, une morphologie, des propriétés cellulaires, mécaniques et métaboliques variables (71). Celles-ci sont appelées zones superficielles, moyennes (ou de transition), profondes (ou radiales) et calcifiées. La Figure 3 illustre la distribution non homogène des cellules et de la MEC dans les zones de cartilage articulaire mature. Chaque zone joue un rôle différent en contribuant aux propriétés fonctionnelles du cartilage articulaire.

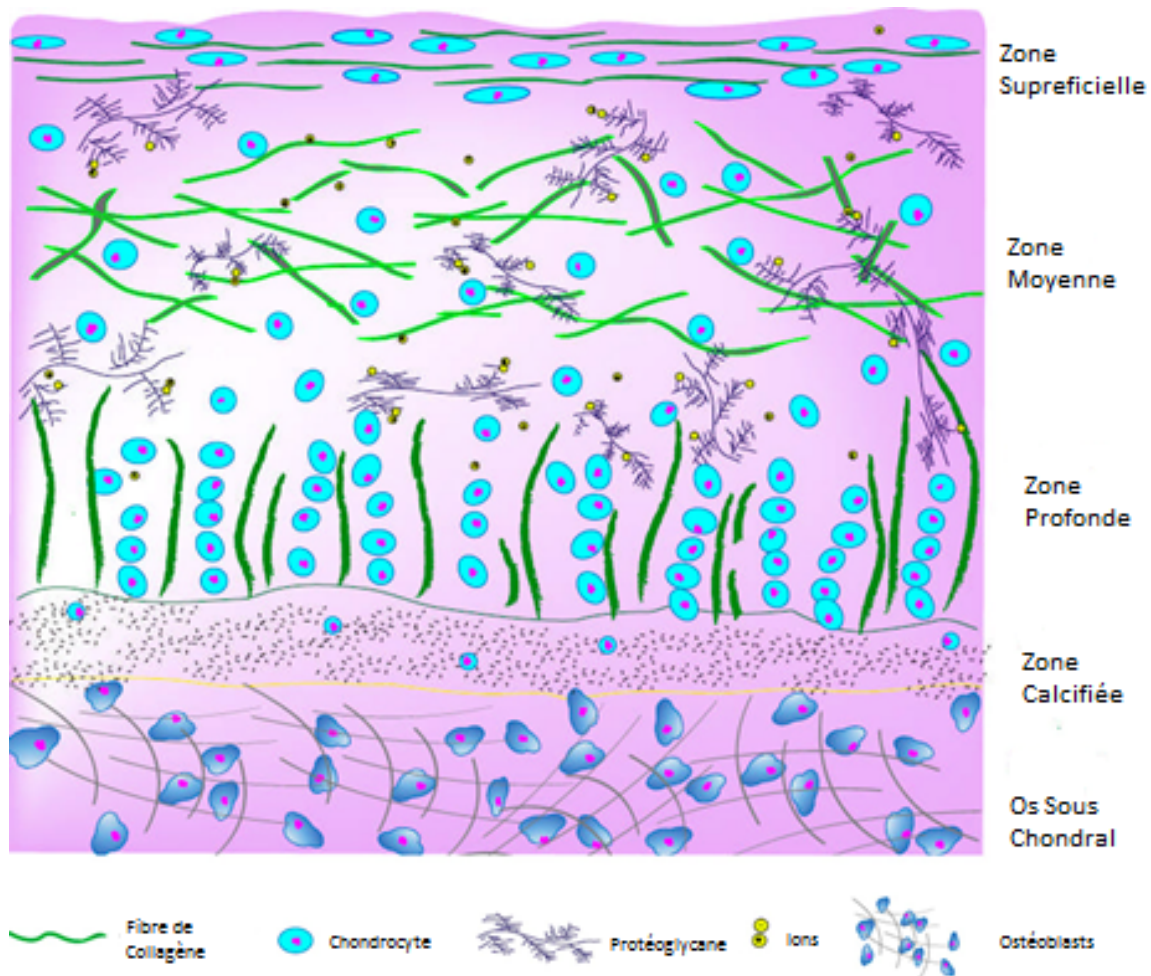


Figure 3: Illustration schématique de la composition et de la structure du cartilage articulaire tapissant l'os.

Le cartilage articulaire comprend quatre zones de structures différentes : superficielle, moyenne, profonde et calcifiée (Adaptée de la référence : 72). (Autorisation demandée)

À partir de la surface articulaire, **la zone superficielle** ne représente que 10 à 20 % de l'épaisseur totale du cartilage articulaire, mais contient la plus grande densité de collagène dans le tissu. De même, un nombre relativement petit de chondrocytes ressemblant à des fibroblastes ayant peu d'organelles sont aplatis dans la zone superficielle et sont orientés parallèlement à la surface et à la direction de la contrainte de cisaillement (73). La MEC de cette zone contient moins de protéoglycanes que d'autres zones. On pense que la composition et l'organisation de cette zone contribuent à la résistance à la traction et au cisaillement pendant le mouvement de l'articulation ainsi qu'à l'ajustement de la perméabilité aux fluides (74).

**La zone médiane** (ou transitoire) est une zone de transit entre les zones superficielle et profonde. Cette zone a la plus forte teneur en protéoglycanes dans les tissus. Lorsqu'ils sont examinés de la zone superficielle à la zone profonde, les teneurs en collagène et en eau diminuent progressivement et la taille des fibres de collagène augmente dans cette zone. Contrairement à la zone superficielle, les chondrocytes de la zone médiane présentent une morphologie arrondie et des organites synthétiques. De plus, les fibrilles de collagène passent d'une orientation tangentielle dans la zone superficielle à une orientation aléatoire afin d'atteindre finalement une orientation perpendiculaire dans la zone profonde (Figure 3) (73, 74).

Dans **la zone profonde**, les fibres de collagène présentent des diamètres plus grands que dans les autres zones. Ils sont organisés en directions radiales (perpendiculaires à la surface articulaire) et sont insérés à travers le repère (une ligne basophile visible séparant les zones profondes et calcifiées). Le rôle fonctionnel de ces collagènes est de renforcer le lien entre le cartilage et les os (75, 76). Les chondrocytes sont emballées dans des colonnes parallèles aux fibres de collagène organisées (Figure 3). De plus, les cellules de la zone profonde présentent des activités synthétiques 10 fois supérieures, bien qu'elles ne présentent que deux fois plus de surface et de volume que les cellules de la zone superficielle (77). Il a été observé que les cellules de la zone profonde synthétisent plus de sulfates de kératine que les cellules des zones supérieures (78).



La zone de transition du cartilage articulaire à l'os sous-chondral est la **zone calcifiée**, qui contient peu de chondrocytes arrondis inertes, inclus dans une MEC calcifiée avec une absence de protéoglycanes. C'est la seule zone de collagène de type X qui favorise la minéralisation du cartilage et assure l'intégrité de la structure (79).

### **5.1.1 Chondrocytes**

Les chondrocytes sont des cellules mésenchymateuses qui ne représentent que 1 % du volume des tissus chez un adulte (80). Les chondrocytes sont non uniformes et leur nombre et leur forme varient selon les zones du cartilage. Ils produisent la matrice extracellulaire et organisent les collagènes, les protéoglycanes et les protéines non collagènes en une structure hautement ordonnée. Leur activité métabolique diffère selon les couches de la plaque cartilagineuse. Par exemple, les cellules de la zone superficielle synthétisent des quantités relatives d'aggrégane et de protéoglycanes non agrégés différentes de celles des chondrocytes dans la couche profonde (81). Les chondrocytes répondent aux différents signaux mécaniques, électriques et physico-chimiques transmis par la matrice extracellulaire toutes en régulant leur activité métabolique.

### **5.1.2 Matrice extracellulaire**

Dans le cartilage articulaire normal, le liquide tissulaire représente entre 65 et 80 % du poids total (98). Les collagènes et les protéoglycanes représentent le poids sec restant. Plusieurs autres classes de molécules peuvent être trouvées en plus petites quantités dans la MEC; ceux-ci comprennent les lipides, les phospholipides, les protéines non collagènes et les glycoprotéines (Figure 4).

La matrice extracellulaire est principalement composée de fluides tissulaires et de macromolécules, notamment de collagène, de protéoglycanes et de protéines différentes du collagène, avec des différences de contenu et de distribution en fonction de l'articulation, du site dans l'articulation et de l'âge (82, 83). Le liquide tissulaire est constitué d'eau contenant des électrolytes, des gaz, de petites protéines et des métabolites dissous. Les interactions entre les macromolécules du fluide et de la matrice assurent la rigidité du tissu et son élasticité aux forces mécaniques.

La matrice a été subdivisée en régions péricellulaires, territoriales et interterritoriales autour de chaque chondrocyte. Ces régions distinctes sont définies par des différences structurelles et une distribution spécifique de protéoglycanes, de protéines de liaison et d'acide hyaluronique (hyaluronane) (84). Ils fonctionnent en synergie pour produire un système de suspension intégré, hydroélastique capable de résister à la compression (85). Chaque chondrocyte est entourée d'une fine matrice péricellulaire qui confère une protection hydrodynamique à la chondrocyte et qui joue un rôle métabolique dans la rétention péricellulaire. La chondrocyte et son microenvironnement péricellulaire représentent ensemble le chondron (86). Chaque chondron est composé d'une seule chondrocyte liée à une forte concentration péricellulaire de protéoglycanes sulfatés, ainsi que l'hyaluronane, le biglycane (87), et une gamme de glycoprotéines de la matrice (86).

La région territoriale est bien définie dans les zones superficielles, transitoires et profondes et se distingue des régions péricellulaires et interterritoriales. Les fibres de collagène ont un diamètre plus important et sont disposées en faisceaux radiaux (88). La concentration de protéoglycanes riches en sulfate de chondroïtine est plus élevée dans cette région (89).

La région interterritoriale est clairement démarquée de la région territoriale (85) et présente une concentration plus élevée en protéoglycanes riches en sulfate de kératane (89). Les fibres de collagène de plus grand diamètre, des arcades de collagène préalablement désigné par Benninghof (90), prédominent dans cette région.

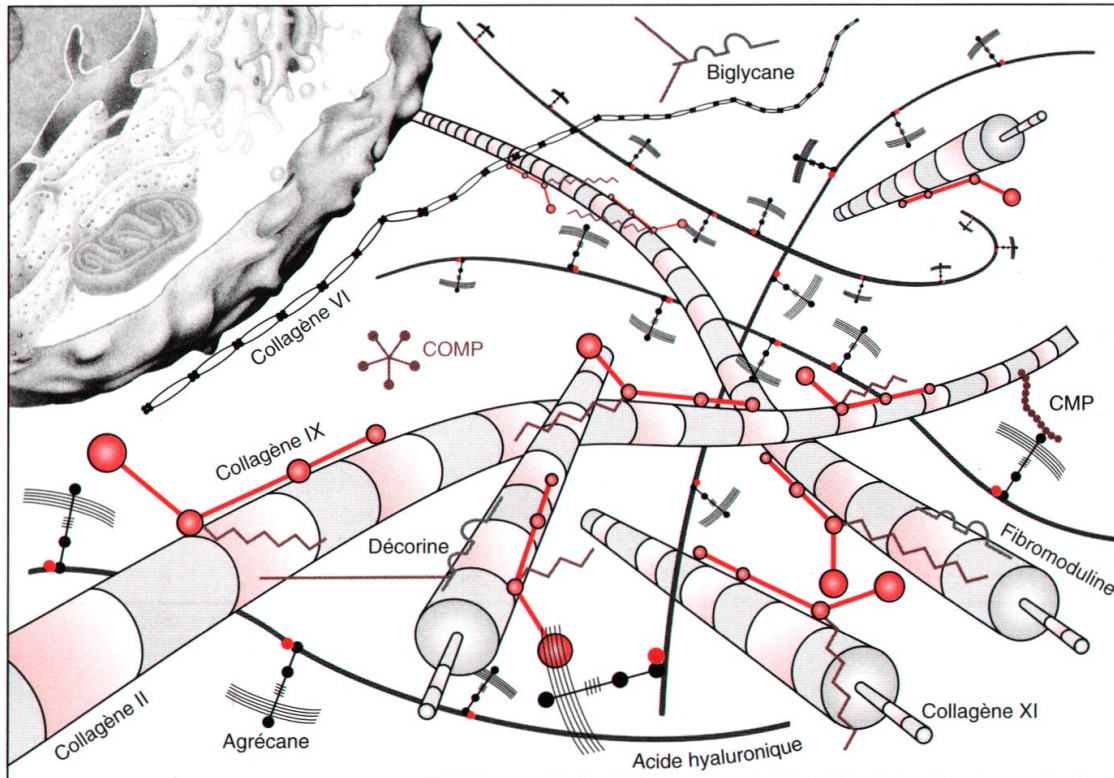


Figure 4: Matrice extracellulaire du cartilage articulaire.

Deux principales macromolécules porteuses sont présentes dans le cartilage articulaire : les collagènes (principalement de type II) et les protéoglycans (notamment l'aggrécane). De plus petites classes de molécules, comme les protéines non collagènes et les protéoglycans plus petits, sont présentes en moindres quantités. L'interaction entre les protéoglycans du cartilage fortement chargés négativement et le collagène de type II fournit la résistance à la compression et à la traction du tissu (Référence : Mallein-Gerin, F ; et al, La culture de chondrocytes : outil d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage, Med Sci (Paris), 1996, Vol. 12, N° 10; p.1087-96).

### 5.1.3 Eau

L'eau est la composante la plus abondante du cartilage articulaire, contribuant jusqu'à 80 % de son poids humide. Environ 30 % de cette eau est associée à l'espace intrafibrillaire au sein du collagène, bien qu'un faible pourcentage soit contenu dans l'espace intracellulaire. Le reste est contenu dans les espaces des pores de la matrice (91, 92). Des ions inorganiques tels que le sodium, le calcium, le chlorure et le potassium sont

dissous dans l'eau des tissus. (93, 94, 95) La concentration relative en eau diminue d'environ 80 % dans la zone superficielle et à 65 % dans la zone profonde (96).

Le flux d'eau à travers le cartilage et la surface articulaire aide à transporter et à distribuer les nutriments aux chondrocytes, en plus de fournir une lubrification. Une grande partie de l'eau interfibrillaire semble exister sous forme de gel, et la majeure partie peut être déplacée à travers la MEC en appliquant un gradient de pression à travers le tissu, ou en comprimant la matrice solide (97, 98). La résistance de friction contre cet écoulement à travers la matrice est très haute ; ainsi, la perméabilité du tissu est très faible. C'est la combinaison de la résistance de friction au débit de l'eau et de sa pressurisation dans la matrice qui forme les 2 mécanismes de base par lesquels le cartilage articulaire tire sa capacité à supporter des charges importantes, souvent plusieurs fois son poids.

#### **5.1.4 Collagène**

Le réseau de collagène ressemble à l'endosquelette du cartilage. Le collagène de type II forme, avec une quantité moindre d'autres collagènes, le réseau fibreux du tissu. Le collagène de type II (80 % à 90 % du collagène total) se compose de trois chaînes  $\alpha$ -1 identiques sous forme hélicoïdale et constitue l'architecture de base du cartilage (99). Le collagène de type XI se trouve dans le collagène de type II (100) et est probablement copolymérisé avec du collagène de type II dans la matrice. Le collagène de type IX représente environ 1 % du collagène total et ses molécules sont liées de manière covalente à la surface des fibrilles de collagène de type II. Le collagène de type IX est concentré péricellulairement, avec de plus petites quantités dans la matrice territoriale et aucune réactivité interterritoriale (101). Le collagène de type X est présent autour des chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance et également dans la zone sous-jacente calcifiée du cartilage articulaire (102). Le collagène microfibrillaire de type VI (99) est situé dans la matrice péricellulaire et présente des niveaux uniformes dans les régions territoriales et interterritoriales (103). Ce type peut aider les chondrocytes à se fixer au cadre macromoléculaire de la matrice. Le collagène de type III est situé dans une zone diffuse autour des chondrocytes péricellulaires (104). Les types II, IX et XI sont spécifiques au cartilage et sont réticulés ensemble dans un réseau qui constitue le cadre extracellulaire,

ce qui donne au tissu sa forme et contribue à sa rigidité, à sa traction et à sa résistance (105).

### **5.1.5 Protéoglycanes**

Les protéoglycanes sont des molécules constituées de chaînes de glycosaminoglycanes liés à un noyau protéique. Les protéoglycanes à gros agrégats (aggrécane) constituent 90 % de la masse totale des protéoglycanes cartilagineux. Les aggrécane sont des macromolécules élastiques qui se dilatent en solution et donnent au tissu sa capacité à résister à la compression ; ils contribuent également à sa durabilité. Les aggrécane se lient à l'hyaluronane et à la protéine de liaison (106), et se composent d'un noyau protéique ainsi que de chaînes de kératane sulfate et de chondroïtine sulfate glycosaminoglycane.

L'acide hyaluronique (hyaluronane) se lie au réseau fibrillaire de collagène et détermine la rétention d'aggrécane dans la matrice extracellulaire (84). L'hyaluronane est synthétisée en abondance dans les chondrocytes et sécrétée par ceux-ci, en particulier dans la zone de transition, alors qu'elle est en grande partie masquée par les constituants des protéoglycanes de la matrice extracellulaire (107).

Les petits protéoglycanes (décorine, biglycane et fibromoduline) représentent environ 3 % de la masse totale de protéoglycanes. Ils se lient aux macromolécules de la matrice et aident à stabiliser la matrice. Le biglycane et la décorine sont deux formes de protéoglycanes au sulfate de dermatane (108) souvent codistribués dans une matrice extracellulaire à travers toutes les couches du cartilage adulte. Ils sont plus concentrés dans la couche de surface et moins concentrés dans les zones profondes ; chez les nouveau-nés, cette distribution est inversée (84).

### **5.1.6 Autres protéines non collagènes**

L'anchoring CII, une protéine non collagène, semble contribuer à ancrer les chondrocytes aux fibrilles de collagène (109). D'autres protéines non collagéniques, y compris la ténascine et la fibronectine, influent sur les interactions entre

les chondrocytes et la matrice. Ils peuvent jouer un rôle en réponse à l'arthrite et à l'arthrose (110, 111).

## **5.2 La nutrition du cartilage articulaire**

Le liquide synovial est un ultrafiltrat plasmatique produit à partir de la membrane synoviale et est composé d'eau et de nutriments comme des électrolytes, de petites molécules et du glucose, ainsi que de déchets métaboliques résultant du renouvellement de la matrice comme l'oxygène et le dioxyde de carbone. Les synoviocytes peuvent synthétiser l'hyaluronate, les protéases et les médiateurs de l'inflammation affectant le cartilage, comme dans l'arthrite (112). Pour atteindre les chondrocytes, les nutriments du liquide synovial doivent passer par un système à double diffusion (d'abord à travers la membrane synoviale, puis à travers la matrice cartilagineuse) (113, 114).

## **5.3 Membrane synoviale**

Le terme synovial fait référence aux tissus mous tapissant les espaces des articulations ; ce sont des tissus conjonctifs très vascularisés. La synoviale est la zone centrale de la pathologie dans un certain nombre de maladies inflammatoires des articulations, notamment la polyarthrite rhumatoïde (PR) et la spondylarthrite (SpA) (115). Cependant, notre connaissance de l'architecture immunohistochimique de la membrane synoviale, en particulier chez les sujets normaux, est étonnamment limitée. On dit que la membrane synoviale normale est une structure constituée d'une couche de doublure de l'intimale distincte, d'une épaisseur de 1 à 2 cellules, et d'une couche sous-jacente synoviale (subintima), cette dernière contenant des vaisseaux sanguins, des cellules adipeuses et des fibroblastes dispersés, et peu de lymphocytes ou de macrophages (115).

En règle générale, la synoviale normale contient une couche intimale dont la section transversale est épaisse de 20 à 40 µm. Sur de nombreux sites, il n'y a pas de membrane discrète, en particulier lorsque le sous-intima est constitué de coussins adipeux ou de tissu fibreux. Cependant, l'aspect synovial normal typique présente souvent des variations considérables, y compris l'absence de cellules intimales (115, 116). Le tissu synovial malade peut perdre toute structure de doublure reconnaissable et ne peut être défini que par sa relation avec une articulation. Chez les patients atteints d'arthrite inflammatoire, comme

la PR, la couche de l'intima est habituellement épaissie, principalement en raison d'une augmentation des macrophages CD68 positifs, avec une région sous-intimale fortement infiltrée, contenant des lymphocytes T et B, des plasmocytes et des macrophages, un œdème stromal associé et une prolifération des vaisseaux sanguins (117).

Le liquide synovial des articulations sert de lubrifiant biologique et confère aux surfaces articulaires du cartilage des propriétés de faible frottement et d'usure minimale afin de faciliter les mouvements. Ces lubrifiants, sécrétés par les cellules synoviales, sont concentrés dans l'espace synovial (118). De plus, les hyaluronanes sont de grosses molécules de polysaccharide naturellement présentes dans le liquide synovial ; ils aident à créer un environnement visqueux qui amortit les articulations et préserve le fonctionnement normal. Une déficience de ce système de lubrification peut contribuer à l'érosion des surfaces du cartilage articulé dans des conditions d'arthrose. Les hyaluronanes sont largement utilisés dans la prise en charge de l'arthrose (119).

#### **5.4 Os sous-chondral**

L'os sous-chondral est formé de la plaque osseuse sous-chondral ainsi que de la partie spongieuse sous articulaire. Le terme « plaque osseuse sous-chondral » ou « zone sous-chondral » est utilisé pour désigner la lamelle osseuse (plaque corticale) située immédiatement au fond de la zone calcifiée du cartilage articulaire (Figure 3). La ligne séparant la zone calcifiée de la plaque osseuse sous-chondral est appelée « ligne de ciment ». En fonction de l'articulation, l'épaisseur de la plaque osseuse sous-chondral est variable. Les trabécules qui en découlent sont appelées « trabécules de soutien » et, avec les autres composants osseux, sont comprises dans le terme « subarticulaire » qui désigne la partie spongieuse sous articulaire (120).

Jusqu'à présent, l'os sous-chondral reste un tissu peut étudier comparativement au cartilage articulaire. On trouve plusieurs significations de l'os sous-chondral parmi eux : 1) C'est le tissu calcifié situé immédiatement sous le repère du cartilage articulaire, 2) la fine lamelle corticale située directement sous l'interligne articulaire discernable radiologiquement, 3) l'os trabéculaire dense immédiatement adjacent à la lamelle corticale, 4) une combinaison de 1), 2), 3) et 5) du tissu subarticulaire total. Duncan *et al.* (121) ont

défini la « plaque sous-chondral » comme étant une zone séparant le cartilage articulaire de la cavité médullaire, constituée normalement de deux couches : la région calcifiée du cartilage articulaire et une couche d'os lamellaire (120).

Bien que le cartilage articulaire hyalin soit principalement composé de collagène de type II, représentant plus de 50 % du poids sec du cartilage, le collagène de type X est présent dans le cartilage calcifié. La plaque corticale, en os, est principalement constituée de collagène de type I. L'observation de surfaces coupées verticalement au microscope électronique à balayage (122) a montré que la plaque sous-chondral située sous la jonction ostéochondrale est composée de feuilles lamellées de fibrilles de collagène parallèles qui continuent dans les lamelles des trabécules osseuses. Les canaux vasculaires occasionnels sont reliés à la jonction ostéochondrale par de petits canaux. Il est important de noter qu'aucune fibre de collagène n'est continue entre le cartilage calcifié et le plateau cortical (Figure 3) (123). Ainsi, la jonction ostéochondrale représente une région de faiblesse. En revanche, la marque qui sépare le cartilage calcifié du cartilage articulaire est traversée par des fibrilles de collagène, ce qui crée un lien assez fort entre ces deux zones (120).

## **6. Physiopathologie de l'arthrose**

L'arthrose est une maladie hétérogène impliquant des boucles de rétroaction mécaniques, biologiques, biochimiques, moléculaires et enzymatiques complexes et en interaction ; la dégénérescence du cartilage étant l'événement final commun (2, 124). Malgré cette dégénérescence, l'arthrose est un processus actif et un réseau de mécanismes réagissant au stress ou à une lésion de l'articulation (25, 123). Toutes les articulations sont touchées par l'arthrose (125). Les modifications structurelles comprennent la fibrillation cartilagineuse, la dégénérescence du cartilage articulaire, l'épaississement de l'os sous-chondral, la formation d'ostéophytes, l'inflammation synoviale, la dégénérescence des ligaments et du ménisque, l'hypertrophie de la capsule articulaire, des modifications cellulaires et moléculaires des nerfs, ainsi que des modifications du muscle périarticulaire (Figure 5) (2, 25, 126). La perte de cartilage et les modifications de l'os et de la membrane synoviale contribuent à créer un environnement biomécanique défavorable, ce qui augmente le stress sur l'articulation et favorise la dégradation du cartilage (24, 126).



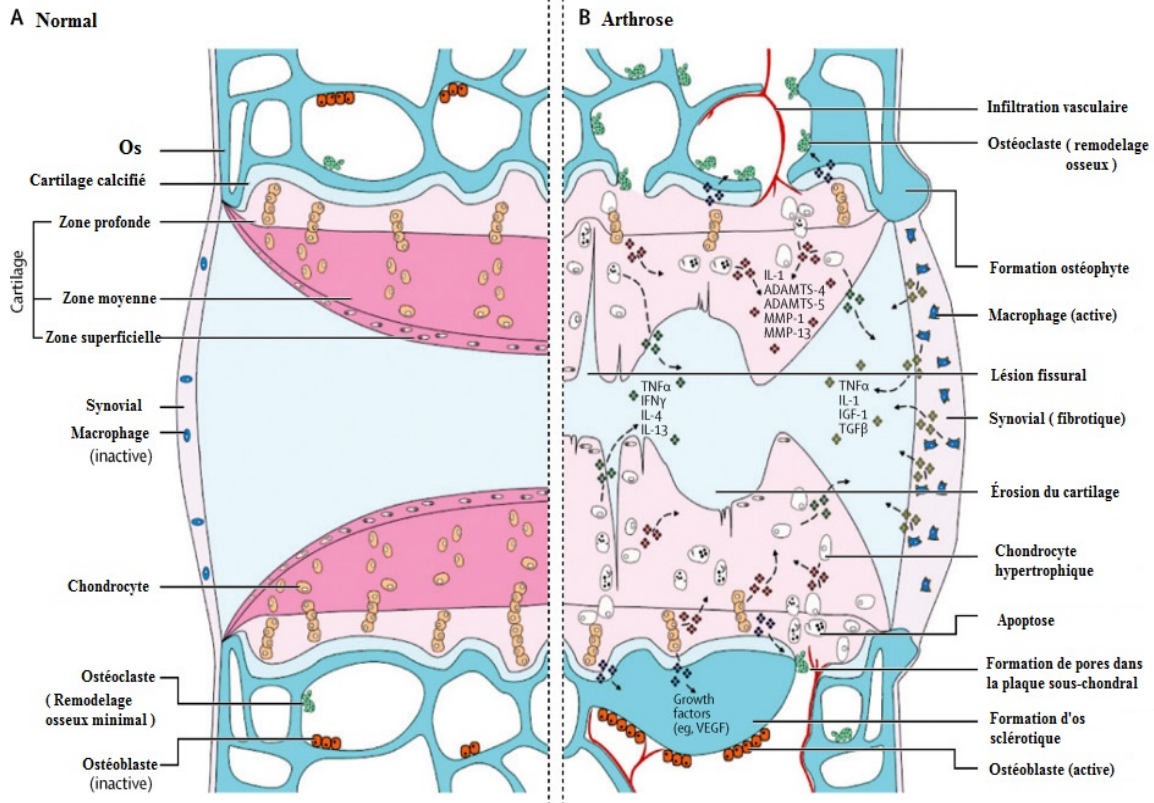


Figure 5: Voies de signalisation et des changements structurels dans le développement de l'arthrose.

ADAMTS = une désintégrine et une métalloprotéinase avec des motifs analogues à ceux de la thrombospondine. IL = interleukine. MMP = métalloprotéinase matricielle. TNF = facteur de nécrose tumorale. IFN = interféron. IGF = facteur de croissance analogue à l'insuline. TGF = facteur de croissance transformant. VEGF = facteur de croissance endothélial vasculaire (Adapté de l'article : Glyn-Jones, S. et *al.*, Osteoarthritis The Lancet, Volume 386, Issue 9991, 2015, Pages 376-387). (Autorisation demandée).

## 6.1 Cartilage

Le cartilage articulaire recouvre les extrémités des os des articulations synoviales afin de fournir une surface lisse ayant un faible frottement pour un glissement efficace, la portance, l'absorption des impacts et pour soutenir les forces de cisaillement lors du mouvement (Figure 2) (127, 130). Il peut remplir ces fonctions en raison de la structure et de la composition de la matrice extracellulaire (MEC) composée de collagène, de

protéoglycanes et d'eau (2). Un réseau de collagène fibrillaire, composé de collagène de type II lié par une protéine matricielle du cartilage (COMP), est organisé en triple hélice et confère au cartilage sa rigidité et sa résistance à la traction (127, 128, 129). L'autre composant principal du cartilage est le protéoglycane aggrecane. Il s'agit d'une grande structure polymère à agrégation avec un grand noyau protéique et 3 domaines globulaires (128). Les chaînes latérales de glycosaminoglycanes (GAG) sur l'aggrecane contiennent un grand nombre de groupes chargés négativement qui attirent et retiennent l'eau pour former un gel qui donne aux cartilages leur capacité de compression (128). Il n'y a pas de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques ou de nerfs dans le cartilage et les chondrocytes sont le seul type de cellules présentes (2). En soi, les chondrocytes sont responsables de la synthèse, de la dégradation et du maintien de la MEC, et répondent aux forces mécaniques, aux contraintes osmotiques, aux facteurs de croissance, aux cytokines et à d'autres médiateurs inflammatoires (25, 128, 129, 130).

Dans l'arthrose, l'équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation de la MEC - maintenue par les chondrocytes - est perturbé et favorise la dégradation (131). L'activité catabolique augmente en réponse à la perte de cartilage produisant ainsi la prolifération cellulaire et la production accrue de protéines matricielles (2, 129, 132). Malgré la tentative de réparation, les protéoglycanes sont dégradés et exposent les fibrilles de collagène de type II qui deviennent ensuite accessibles à la dégradation (25).

Les chondrocytes produisent et libèrent une métalloprotéinase matricielle (MMP) et une enzyme désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines (ADAMTS), responsables du clivage des fibrilles et des aggrecanes du collagène (20). De manière cyclique, les parties clivées de la MEC peuvent agir sur les chondrocytes ou se diffuser vers la membrane synoviale pour initier la signalisation des kinases, produisant davantage d'enzymes et de médiateurs inflammatoires (Figure 5) (25, 133). Bien que les rôles exacts de ces médiateurs soient inconnus, l'interleukine 1-bêta (IL-1b), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 6 (IL-6), le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), l'interleukine 17 (IL-17), l'interleukine 18 (IL-18), l'oxyde nitrique (NO), la prostaglandine E2 (PGE2) et les leucotriènes sont augmentés dans l'arthrose et sont impliqués dans la pathogenèse de la maladie (124, 127). On ignore si l'inflammation de l'arthrose survient en

tant qu'événement initial ou secondaire à la dégradation du cartilage (134). Avec la perte de cartilage et l'augmentation du stress inflammatoire et oxydatif, il se produit une apoptose des chondrocytes (131). Les chondrocytes synthétisent une nouvelle aggrécane et du collagène lors d'une tentative de réparation, mais la nouvelle aggrécane est similaire aux protéoglycanes juvéniles. Le collagène produit est de type X et aucun de ceux-ci ne peut conserver les mêmes propriétés mécaniques que le cartilage adulte sain (127, 135).

Cette composition anormale contribue à un environnement biomécanique défavorable, stimulant davantage la dégradation (25). Les modifications du cartilage ne sont pas directement responsables de la douleur liée à l'arthrose, car le cartilage n'est pas innervé et ne génère donc pas de douleur, mais les autres structures articulaires le sont amplement (131).

## 6.2 Os

Les altérations osseuses sont reconnues pour être importantes dans la pathogenèse de l'arthrose, bien qu'elles soient moins bien comprises que les modifications du cartilage (136). Dans l'arthrose, la structure et les propriétés de l'os sous-chondral sont altérées par l'augmentation de l'épaisseur de la plaque sous-chondral, la modification de l'architecture de l'os trabéculaire, la formation d'un nouvel os (ostéophytes) au niveau des articulations et des modifications de la vascularisation (Figure 5) (2, 129, 136). Les lésions de la moelle osseuse sont également communes et consistent en une nécrose, des anomalies trabéculaires, une fibrose de la moelle osseuse et un œdème (22, 137). Ceux-ci sont supposés résulter d'un chargement excessif répétitif ou d'une réponse inflammatoire aiguë (25, 137). Il est prouvé que les modifications de l'os sous-chondral précèdent la dégradation du cartilage (2, 129).

Des modifications osseuses pourraient favoriser un métabolisme anormal du cartilage en réduisant le soutien structurel, en altérant l'apport en éléments nutritifs et en apportant des facteurs cataboliques (2, 22, 129). Une rigidité osseuse accrue pourrait également rendre le cartilage moins efficace pour supporter les charges mécaniques (129). Comme les os sont richement innervés, ils pourraient constituer une source potentielle de douleur dans l'arthrose (138). Par ailleurs, plusieurs études ont établi une corrélation entre

les anomalies osseuses observées par imagerie par résonance magnétique (IRM) et les douleurs au genou causées par l'arthrose (138, 139, 140).

### **6.3 Membrane synoviale**

La membrane synoviale est une fine feuille de tissu conjonctif qui recouvre toutes les structures de l'articulation, à l'exception du cartilage (2). Elle est bien vascularisée et innervée, et contient des cellules qui phagocytent les débris, sécrète de l'acide hyaluronique (HA) et de la synovie pour lubrifier l'articulation, facilitant ainsi le glissement pendant les mouvements (2, 25).

Une inflammation de la membrane synoviale ainsi qu'une hypertrophie synoviale et une hyperplasie surviennent dans l'arthrose (2). Les produits de dégradation du cartilage se diffusent dans la membrane synoviale où ils sont phagocytés par les macrophages, ce qui déclenche la libération de cytokines, d'espèces réactives de l'oxygène et l'inflammation synoviale (2). Ces cytokines sont ensuite libérées dans le liquide synovial où elles peuvent se diffuser dans le cartilage pour agir sur les chondrocytes, poursuivant ainsi le cycle de la dégradation et de l'inflammation (2).

Les cellules synoviales sont également capables de produire des MMP et des ADAMTS en réponse à une signalisation inflammatoire (141). On pense également que les ROS produites dans l'inflammation synoviale jouent un rôle dans l'arthrose en décomposant la MEC, en régulant les enzymes dégradant la matrice et en inhibant les signaux anaboliques (142, 143). Comme la membrane synoviale est richement innervée, l'inflammation synoviale est potentiellement une source importante de douleur dans l'arthrose, et des relations significatives entre la synovite et les symptômes d'arthrose ont été rapportées dans plusieurs études (2, 144, 145, 146).

### **6.4 Ménisques et ligaments**

Les ménisques du genou sont deux coussinets de fibrocartilage situés entre le fémur et le tibia et qui sont fixés à la capsule articulaire (147). Les ménisques font partie intégrante du système biomécanique de l'articulation du genou et stabilisent l'articulation,

résistent à la tension, à la compression et au stress, et absorbent les chocs lors des mouvements dynamiques (2, 147).

Il y a 3 ligaments dans le genou. Ceux-ci sont constitués de fibres de collagène disposées en faisceaux parallèles qui assurent la stabilité antéropostérieure et en rotation du genou, préviennent l'hyperextension et fournissent des informations proprioceptives (148, 149). Les changements pathologiques au niveau des ménisques et des ligaments sont fréquents chez les adultes atteints de gonarthrose (arthrose du genou), même chez ceux qui n'ont pas subi de lésion antérieure (22, 25). Ces changements pathologiques comprennent la perturbation de la matrice, la fibrillation, les amas cellulaires, la calcification et la mort cellulaire, tous susceptibles d'altérer la cinématique du genou et de contraindre les zones cartilagineuses inhabituelles, favorisant ainsi la dégradation du cartilage (25).

En outre, des augmentations de la pénétration vasculaire et de l'innervation ont été rapportées dans les ménisques de l'arthrose, suggérant une source potentiellement importante de douleur dans l'arthrose (150).

## **7. Les médiateurs et facteurs impliqués dans l'arthrose**

### **7.1 Facteurs cataboliques**

#### **7.1.1 MMPs**

Les métalloprotéinases matricielles sont une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes collectivement capables de dégrader tous les composants de la matrice extracellulaire. Les actions de ces enzymes sont puissantes et hautement cataboliques, et, en elles-mêmes, les expressions des gènes codant pour les métalloprotéinases matricielles sont strictement régulées et réservées aux cas où un remodelage dramatique est nécessaire, comme lors de la cicatrisation (151) et du développement embryonnaire (152). Leurs polyvalences et leurs efficacités en font également des effecteurs puissants des processus pathologiques, y compris l'initiation et la métastase tumorale, l'athérosclérose, l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde.

Il a été démontré que 7 métalloprotéinases matricielles (MMP-1, 2, 3, 8, 9, 13 et 14) sont exprimées dans différentes circonstances. Parmi elles, 4 ont été trouvées constitutivement exprimées dans le cartilage adulte, jouant vraisemblablement un rôle dans le renouvellement des tissus, et régulées à la hausse dans les états pathologiques - MMP-1, MMP-2, MMP-13 et MMP-14 (153). La présence de MMP-3, MMP-8 et MMP-9 dans le cartilage semble être caractéristique des circonstances pathologiques seulement.

La **MMP-1** (collagénase interstitielle) est impliquée dans la dégradation des collagènes de types I, II et III. Dans le développement embryonnaire, son expression est limitée aux zones de formation osseuse endochondrale et intramembranaire (154). Elle est particulièrement abondante dans les métaphyses et la diaphyse des os longs. Pendant ce temps, elle est exprimée seulement dans les chondrocytes hypertrophiques (immédiatement avant la différenciation terminale dans l'ossification endochondrale) et les ostéoblastes (154). Les niveaux d'expression sont faibles dans des conditions saines, mais une régulation positive significative est observée dans le cartilage arthritique; cette régulation peut jouer un rôle actif dans la dégradation du collagène dans ce tissu, mais est manifestement absente dans le cas de la synovite (155).

La **MMP-3** (stromélysine-1) est capable de dégrader un large éventail de molécules extracellulaires, y compris les collagènes de types II, III, IV, IX et X, la fibronectine, la laminine, l'élastine et divers protéoglycanes. En outre, elle s'est avérée avoir une activité d'un facteur de transcription, apparemment capable de réguler positivement l'expression d'autres métalloprotéinases matricielles (156). Elle intervient dans la cicatrisation, l'expression étant typique des fibroblastes et des cellules épithéliales après stimulation de ces derniers par des composés pro-inflammatoires (157); Expliquant ainsi la présence de taux élevés de MMP-3 dans le cartilage arthrosique et dans la synoviale dans l'arthrose (158), et l'absence dans les tissus de l'articulation normale. Cette enzyme peut être considérée comme étant un marqueur pour l'arthrose (159).

La **MMP-13** est de loin la plus étudiée des métalloprotéinases matricielles quant à son rôle dans le cartilage, car elle est considérée comme le principal effecteur catabolique

dans l'arthrose et dans d'autres formes d'arthrite grâce à sa capacité à cliver le collagène de type II prédominant dans le cartilage articulaire.

Ayant un tel effet unique et dramatique, il est évident que la MMP-13 est fréquemment utilisée comme métalloprotéinase matricielle de choix dans la détection et l'étude de l'arthrose. Elle est particulièrement révélatrice et supporte son utilité en tant que biomarqueur dans l'arthrose. Bien que cette enzyme soit principalement impliquée dans la dégradation du collagène de type II, elle cible également d'autres molécules de la matrice comme le collagène de types IV et IX, le perlécan, l'ostéonectine et le protéoglycane (160). Elle est probablement impliquée dans le renouvellement de la matrice du cartilage sain.

L'expression génétique de la MMP-13 semble se produire à travers un certain nombre de voies moléculaires qui fonctionnent soit par l'inflammation, soit par les cils primaires qui se trouve sur la surface des cellules. . Il a été montré que la protéine nucléaire 1 (Nupr1) inducible par le stress régulait l'expression de la MMP-13 *in vitro* (161). Yammani et Loeser ont montré que Nupr1, exprimée dans le cartilage, est nécessaire pour l'expression de MMP-13 via IL-1 $\beta$ . Cela pourrait être une voie pour les effets cataboliques de l'arthrose soient médiés par l'inflammation. Ceci est particulièrement intéressant à la lumière de l'étude réalisée par Xu *et al.* (2015) dans laquelle ils ont analysé l'expression différentielle de gènes dans le cartilage impliqués dans l'arthrose et dans la PR (162). Bien que ces chercheurs aient identifié plusieurs gènes associés à la régulation des MMP, les gènes prédominants étaient associés à l'inflammation. Cela pourrait donner une plus grande crédibilité au rôle des signaux inflammatoires précoces (c'est-à-dire AGE et IL-1) dans l'initiation et dans la progression de l'arthrose.

L'activation des MMP peut être inhibée par les TIMP. Les TIMP le font en formant un complexe de haute affinité (127). Il semble que les conditions dans les tissus arthrosiques favorisent la synthèse et l'activation des MMP plutôt que l'inhibition. En effet, un manque de TIMP suffisant pour contrer l'augmentation de la production de MMP pourrait contribuer à la dégradation du cartilage articulaire arthrosique (127).

### 7.1.2 ADAMTS

Les aggrecanases font partie de la famille de protéines "ADAMTS" (une désintégrine et une métalloprotéinase avec des motifs de thrombospondine). Il existe actuellement 19 gènes ADAMTS connus chez l'homme, numérotés ADAMTS-1 à ADAMTS-20 (164). Il a été démontré que le clivage des aggrecanes au niveau des sites aggrecanases est responsable de la dégradation du cartilage *in vitro* (164, 165) et *in vivo* (166). Ainsi, des néoépitopes aggrecanes générés par des aggrecanases se retrouvent dans les liquides synoviaux des patients souffrant d'arthrose (167, 168). De plus, il est également montré que, contrairement aux inhibiteurs de la MMP, les inhibiteurs de l'aggrecanase pouvaient bloquer la dégradation du cartilage arthrosique humain (164), attestant de l'importance des aggrecanases dans la destruction de la matrice cartilagineuse. La recherche sur les causes responsables de la dégradation de la matrice cartilagineuse indique que les membres de la famille ADAMTS sont les plus importantes. Les enzymes ADAMTS, ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 et -20, phylogénétiquement proches (169), sont considérées comme des aggrecanases potentielles. Les 3 seules ADAMTS capables de cliver l'aggrecane sur les 4 sites d'aggrecanase situés dans la région riche en GAG sont les ADAMTS-1, -4 et -5 (170, 171), ce qui en fait des aggrecanases puissantes.

**Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) :** L'aggrecanase-1 a été bien étudié et la preuve de son importance dans le catabolisme de l'aggrecane dans le cartilage est de plus en plus solide. La protéine ADAMTS-4 s'est révélée être colocalisée avec les produits de dégradation de l'aggrecane *in vitro* et *in vivo* (172). Il a été démontré que l'inhibition sélective d'ADAMTS-4 et d'ADAMTS-5 bloquait la dégradation du collagène de type-II par son effet protecteur sur les molécules d'aggrecane (173). Cependant, même s'il a été démontré qu'ADAMTS-4 était capable de cliver la molécule d'aggrecane *in vitro* (165), les études menées sur des souris ADAMTS-4 knock-out n'ont pas montré de protection contre la perte d'aggrecane à la suite d'une chirurgie de déstabilisation du genou. (174). Une étude similaire réalisée par Stanton *et al.* a montré que, *in vitro*, l'expression de ADAMTS-4 n'est pas induite par l'IL-1 $\alpha$  chez la souris, ce qui suggère qu'ADAMTS-4 pourrait ne pas être une aggrecanase importante dans l'arthrose chez la souris (175). Cependant, dans l'arthrose humaine, ADAMTS-4 semble jouer un rôle important dans la dégradation de l'aggrecane.



En fait, cette aggrecanase est induite *in vitro* dans le cartilage humain par des cytokines pro-inflammatoires (176) et elle est augmentée dans le cartilage arthrosique (172, 177).

**Aggrecanase-2 (ADAMTS-5) :** L'aggrecanase-2 a également été bien étudié et son importance dans le catabolisme de l'aggrecane dans le cartilage a été démontrée. Comme mentionné pour ADAMTS-4, il est démontré que l'inhibition sélective d'ADAMTS 4 et d'ADAMTS-5 avait un effet protecteur sur les molécules d'aggrecane (173). Des études menées avec des souris ADAMTS-5 knock-out et ADAMTS-4 / -5 double knock-out ont montré que ces animaux sont plus résistants à la dégradation du cartilage après une chirurgie de déstabilisation au genou (174, 175). *In vitro*, l'expression d'ADAMTS-5 est induite par l'IL-1 $\alpha$  chez la souris, ce qui démontre son importance dans le traitement de l'arthrose chez cette espèce (175). ADAMTS-5 est également important chez l'humain. Son expression est élevée dans le cartilage arthrosique humain et il est responsable de la dégradation de l'aggrecane dans le cartilage normal et malade (176, 178, 179). Cependant, des polymorphismes présumés dommageables dans le gène ADAMTS-5 n'ont montré aucune modification de la sensibilité à l'arthrose (180). La recherche sur l'aggrecanase la plus importante dans l'arthrose humaine est toujours en cours.

D'autres études et recherches sont également en cours sur l'importance des autres ADAMTS, ainsi que leur rôle dans la dégradation du cartilage. Par exemple, lors d'une certaine étude, on aurait trouvé la présence d'ARNm et de protéines d'ADAMTS-1 dans le cartilage normal et arthrosique (181), mais leurs effets et leur rôle restent toujours à décoder.

## 7.2 Facteurs anaboliques

Dans le cartilage sain, il se produit un faible renouvellement des molécules de la matrice extracellulaire. Un bon équilibre des activités anaboliques et cataboliques est donc crucial pour le maintien de l'intégrité du tissu cartilagineux et pour la réparation des dommages moléculaires subis au cours de notre vie. Chez les personnes atteintes d'arthrose, cet équilibre entre activités anaboliques et cataboliques est compromis, et l'ampleur de la dégradation des tissus prédomine sur la capacité de réparation des tissus (182). Dans l'arthrose, une élévation des facteurs anti-anaboliques et cataboliques se produit. Fait

intéressant, l'activité anabolique est également augmentée, mais cette réponse ne parvient pas à réparer le tissu en raison d'une insuffisance quantitative et qualitative. Parmi les facteurs anaboliques les plus étudiés au cours de la maladie, on trouve le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), les protéines osseuses morphogénétiques (BMPs) et le facteur de croissance analogue à l'insuline - 1 (IGFs) (182).

### 7.2.1 TGF- $\beta$

Le **facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ )** est une famille de protéines dimériques impliquées dans de multiples activités de signalisation biologique, y compris la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans les chondrocytes arthrosiques, le TGF- $\beta$  favorise l'expression du collagène de type II et de l'aggrécane, et régule négativement les enzymes dégradant la matrice, contrecarrant ainsi la dégradation de la matrice du cartilage induite par l'IL-1 $\beta$  (183, 184). Cet effet du TGF- $\beta$  est réduit au cours du vieillissement et peut être responsable du niveau plus élevé de dégénérescence du cartilage dans le cartilage âgé (185). Les niveaux d'expression des récepteurs TGF- $\beta$  dans les chondrocytes sont réduits chez les personnes souffrant d'arthrose et chez les personnes âgées, ce qui entraîne une diminution de la réactivité au facteur de croissance anabolique (185).

### 7.2.2 BMP

Les **BMP** sont des protéines de signalisation qui appartiennent à la superfamille des TGF- $\beta$  et elles participent à la régulation de nombreux processus de développement physiologiques. L'une de leurs fonctions principales est le maintien du cartilage articulaire (182). Les BMP du cartilage les plus étudiées sont BMP-2, BMP-4 et BMP-7. La BMP-2 est régulée positivement dans les chondrocytes arthrosiques par les cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  et il a été démontré qu'elle augmentait l'expression de gènes de la matrice extracellulaire comme le collagène de type II dans les chondrocytes (186, 187). Contrairement à la BMP-4, la BMP-7 est régulée négativement dans les chondrocytes arthrosiques. La BMP-7 a un effet positif sur la biosynthèse de la matrice et peut inverser l'inhibition de la biosynthèse des protéoglycanes induite par l'IL-1 $\beta$  *in vitro*, ce qui suggère que les activités anaboliques et anti-cataboliques sont affectées dans les chondrocytes arthrosiques (188, 189, 190).

Les données expérimentales disponibles suggèrent que, parmi les BMP, la BMP-7 a l'effet anti-dégénératif le plus puissant. Par exemple, la BMP-7 injectée par voie intra-articulaire présente des effets chondroprotecteurs *in vivo* dans des modèles d'arthrose (191, 192). D'autres membres de la famille BMP, comme BMP-4, ont également démontré des effets anaboliques sur les chondrocytes, mais leur rôle dans l'arthrose n'est pas bien étudié. Outre la régulation de l'expression des gènes, l'activité des BMP *in vivo* est également régulée par les antagonistes des BMP, protéines solubles qui inhibent l'interaction des BMP avec leurs récepteurs apparentés. Par exemple, l'expression des antagonistes des BMP - la gremlin et la follistatine - est régulée pendant l'arthrose, ce qui ajoute à la complexité du contrôle (193, 194). Enfin, il apparaît que les effets des différentes BMP sur les chondrocytes articulaires sont dépendants de l'âge et que, l'arthrose étant principalement une maladie des personnes âgées, sa progression peut être en partie affectée en fonction de ce phénomène (195, 196).

Dans une revue, van der Kraan *et al.* (197) ont discuté du double rôle des BMP dans l'arthrose. La signalisation BMP stimule à la fois la synthèse de la matrice et la différenciation des chondrocytes terminaux comme on le voit dans les chondrocytes sur la plaque de croissance. Cette différenciation des chondrocytes terminaux entraîne une production accrue de MMP-13, ce qui augmente la dégradation de la matrice. Les auteurs concluent que la signalisation BMP dans l'arthrose des chondrocytes a des effets à la fois anaboliques et cataboliques, et qu'il est difficile de déterminer quel effet est dominant (182).

### 7.2.3 IGF-1

Le **facteur de croissance de type insuline-1 (IGF-1)** joue un rôle crucial dans l'homéostasie du cartilage en stimulant la production de matrice extracellulaire et en inhibant la dégradation de la matrice (198, 199). L'expression de l'IGF-1 est induite par l'hormone de croissance, et une déficience en hormone de croissance suivie d'un déficit en IGF-1 conduit à des lésions similaires à celles de l'arthrose chez le rat (200).

L'IGF-1 humain et son récepteur sont fortement exprimés dans les chondrocytes arthrosiques (182). Cependant, ces cellules ne réagissent pas à l'IGF-1, malgré le niveau

élevé d'expression du récepteur de l'IGF-1, en raison de l'inhibition des interactions du récepteur-ligand de l'IGF-1 par les protéines de liaison à l'IGF, également fortement exprimées dans les chondrocytes arthrosiques (201). Notamment, l'expression de la protéine de liaison à l'IGF-3 augmente dans les chondrocytes arthrosiques et diminue fonctionnellement les effets anaboliques de l'IGF-1 dans ces cellules (198, 202, 203). Ainsi, la réactivité du cartilage arthrosique à la signalisation anabolique de l'IGF-1 est fortement régulée en fonction de la concentration en protéines de liaison à l'IGF.

Les actions anaboliques de l'IGF-1 sont probablement impliquées dans la réponse des chondrocytes arthrosiques aux signaux inflammatoires. Par exemple, le médiateur inflammatoire NO inhibe les effets anaboliques de l'IGF-1 sur les chondrocytes (204). D'autre part, l'IGF-1 protège le cartilage contre les effets cataboliques induits par l'IL-1 $\beta$  par la régulation de l'expression du récepteur de leurre IL-1, IL-1R2 (205).

### **7.3 Médiateurs pro-inflammatoires**

#### **7.3.1 Cytokine :**

Au cours de la progression de l'arthrose, le phénotype catabolique est maintenu par un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires, y compris l'interleukine-1 (IL-1), facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 et IL-17 (206). Selon leur action et le métabolisme du cartilage, ils peuvent être divisés en cataboliques, cytokines anti-cataboliques et modulateurs (207). Les mieux étudiés des cytokines touchant la maladie dégénérative du cartilage sont l'IL-1 et TNF- $\alpha$ .

Aujourd'hui, des agents pharmacologiques inhibant spécifiquement les deux IL-1 et TNF- $\alpha$  chez les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde sont disponibles.

##### **7.3.1.1 L'interleukine-1 bêta (IL-1 $\beta$ )**

L'interleukine-1 bêta (IL-1 $\beta$ ) est l'une des cytokines les mieux étudiées car il est considéré comme l'une des clés impliquées dans la pathogenèse de l'arthrose. Il induit des réactions inflammatoires et un effet catabolique, indépendamment ou bien associé à d'autres médiateurs, au niveau de l'articulation. Sa synthèse dans l'articulation est régie par

les chondrocytes, les ostéoblastes, les cellules formant la membrane synoviale et les cellules mononucléées présentes dans l'articulation ou infiltrées dans sa structure pendant la réponse inflammatoire (208, 209, 210).

Les patients atteints d'arthrose présentent un taux élevé d'IL-1 $\beta$  à la fois dans le liquide synovial, la membrane synoviale, le cartilage et la partie osseuse sous-chondral (209, 211, 212, 213). L'activation biologique des cellules par l'IL-1 $\beta$  est médiée par l'interaction avec le récepteur membranaire, à savoir l'IL-1R1 (IL-1RI, CD121a), qui peut également se lier à l'IL-1 $\alpha$  et à l'IL-1Ra (214). Un autre récepteur l'IL-1R2 (IL-1RII, CD121b) est aussi capable de lier l'IL-1 $\beta$ , qui forme un complexe récepteur ligand inactif après liaison de l'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-1Ra. Qui ne montre aucune capacité à communiquer et à activer le signal intracellulaire (215). À ce stade, il convient de mentionner la présence de l'antagoniste des récepteurs IL-1Ra produit par certaines cellules de l'articulation, qui (comme indiqué ci-dessus) peuvent se lier à l'IL-1R1 et à l'IL-1R2, bloquant ainsi leur liaison avec l'IL-1 $\beta$ . Ce qui peut dans une certaine mesure affecter la diminution de l'activité de l'IL-1 $\beta$  (216, 217). L'expression du récepteur de l'IL-1R1 est augmentée chez les patients atteints d'arthrose à la surface des chondrocytes et des synoviocytes fibroblastiques (*fibroblast-like synoviocytes-FLS*) par rapport aux groupes de traitement (218, 219).

L'effet de l'IL-1 $\beta$  se manifeste par son effet significatif sur le métabolisme des cellules et la matrice extracellulaire (ECM) (220). Au cours de la maladie, la perte progressive du cartilage articulaire est d'une importance capitale. De nombreuses études confirment que l'effet de l'IL-1 $\beta$  bloque la synthèse de la MEC par les chondrocytes, interférant avec la synthèse des protéines structurelles clés telles que le collagène de type II et l'aggrécane (221, 222). Outre la diminution de la synthèse des éléments constitutifs, l'IL-1 $\beta$  affecte le fonctionnement des chondrocytes dans la synthèse des enzymes du groupe des métalloprotéinases (MMP), principalement la collagénase interstitielle (MMP-1), la stromélysine-1 (MMP-3) et la collagénase 3 (MMP-13), qui ont un effet destructeur sur les composants du cartilage (223, 224). En plus de l'induction des enzymes de la famille des MMP, l'IL-1 $\beta$  affecte la production des métalloprotéinases ADAMTS, responsables de la protéolyse des molécules d'aggrécane (225). Un rôle majeur est attribué à ADAMTS-

4, dont la production est stimulée à la fois par l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , alors que l'ADAMTS-5 n'a aucune corrélation avec l'influence des cytokines et est produite de manière constitutive (225, 226).

Les chondrocytes soumis à l'effet de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$  ont également tendance à vieillir plus rapidement et à induire l'apoptose (227, 228). En analysant les informations ci-dessus, on peut observer l'effet multiple de l'IL-1 $\beta$  sur le cartilage en inhibant sa possibilité de restauration, en intensifiant sa détérioration par les enzymes et aussi avoir un effet néfaste direct sur les chondrocytes. Dans les cellules de l'articulation, l'IL-1 $\beta$  est capable d'induire sa propre sécrétion de manière autocrine pour stimuler la synthèse d'autres cytokines telles que, par exemple, les cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8 (229, 230). De plus, des effets sont observés sur la sécrétion d'un certain nombre d'enzymes et de médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'arthrose. Ces composés peuvent inclure l'iNOS générant le NO, la phospholipase A2 (PLA2), la cyclooxygénase-2 (COX-2), la prostaglandine E synthase 2 (PGE<sub>2</sub> synthase) produisant la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (231, 232). Au cours de la maladie, l'IL-1 $\beta$  stimule la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui génèrent par exemple la formation de peroxydes et de radicaux hydroxylés, qui endommagent directement le cartilage articulaire. L'intensification de ce processus est également associée à une diminution de l'expression des enzymes oxydantes, observée dans l'articulation atteinte par la maladie (voir plus loin) (233).

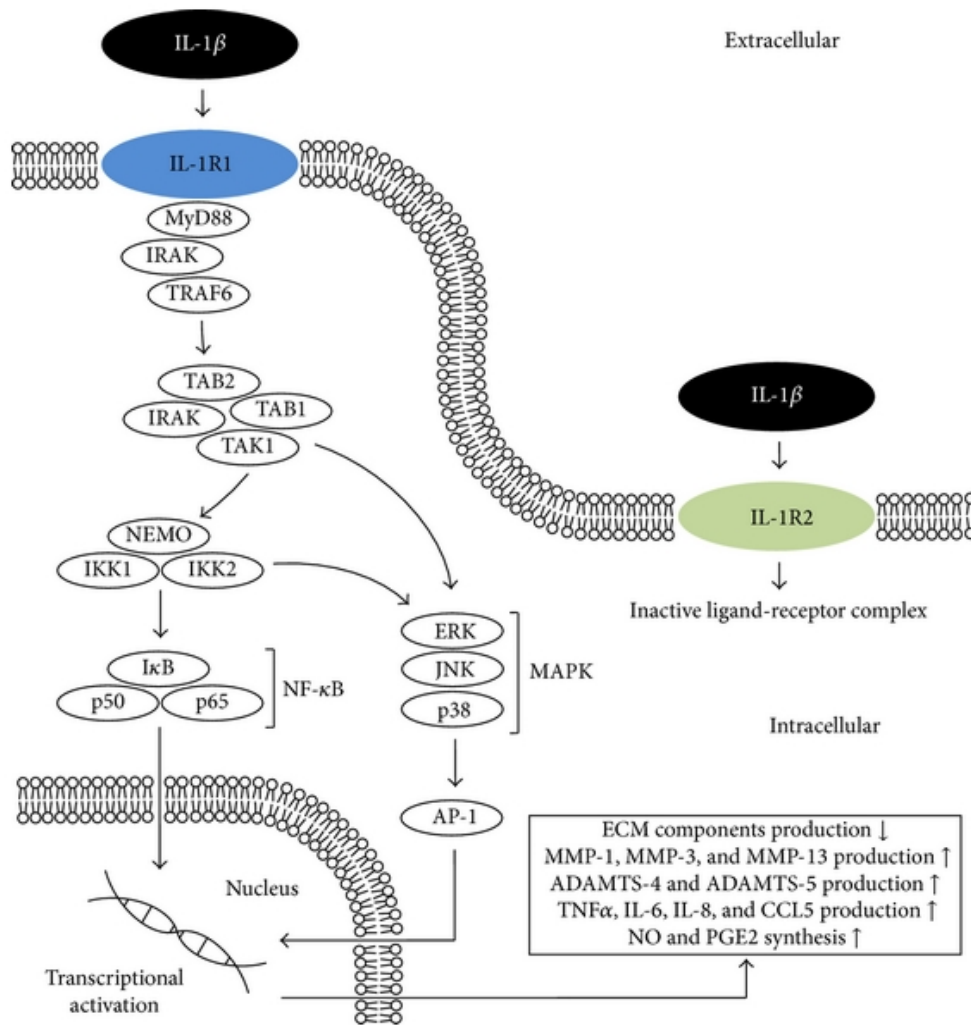


Figure 6: Voies de signalisation intracellulaires associées à l'IL-1 $\beta$  et cibles et effets cellulaires en aval.

IL-1R1 : récepteur de l'interleukine-1, type 1; IL-1R2 : récepteur de l'interleukine-1, type 2; MyD88 : gène primaire de la différenciation myéloïde; IRAK : kinase associée au récepteur de l'interleukine-1; TRAF6 : facteur 6 associé au récepteur du TNF; TAK1 : également connu sous le nom de protéine kinase kinase 7 activée par un mitogène (MAP3K7); TAB1 : également connu sous le nom de protéine 1 interagissant avec la protéine kinase kinase 7 activée par un mitogène (MAP3K7IP1); TAB2 : également connu sous le nom de protéine 2 interagissant avec la protéine kinase kinase 7 activée par un mitogène (MAP3K7IP2); p50, p65 : sous-unités de protéines formant NF- $\kappa$ B; I $\kappa$ B : (inhibiteur de  $\kappa$ B) un complexe endogène de protéines inhibant l'activation de NF- $\kappa$ B; IKK1,2 / NEMO : inhibiteur de la NF- $\kappa$ B kinase 1,2 (IKB kinase 1,2) / inhibiteur de NF- $\kappa$ B kinase (modulateur essentiel de NF- $\kappa$ B); ERK : kinase régulée par un signal

extracellulaire; JNK : kinase N-terminale c-Jun; p38 : protéines kinases activées par un mitogène p38; MAPK : protéines kinases activées par des mitogènes; AP-1 : protéine activatrice 1. (Référence: Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A., & Szukiewicz, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation*, 2014, 561459). (Autoriser à utiliser la figure)

### 7.3.1.2 Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ )

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), associé à l'IL-1 $\beta$ , est considéré comme une cytokine inflammatoire clé impliquée dans les processus physiopathologiques de l'arthrose. Le TNF- $\alpha$  est sécrété par les mêmes cellules de l'articulation qui synthétisent l'IL-1 $\beta$ , et sa concentration étendue est également observée dans les mêmes éléments, tels que le liquide synovial, la membrane synoviale, le cartilage et l'os sous-chondral, où des taux accrus d'IL-1 $\beta$  sont également détectés (209, 211, 212, 213).

Cette cytokine a la capacité de se lier aux deux isotypes des récepteurs membranaires TNF-R1 (p55, CD120a et TNFRSF1a) et TNF-R2 (p75, CD120b et TNFRSF1b), situés à la surface de presque toutes les cellules nucléées (234, 235). Le récepteur TNF-R1 peut être efficacement activé par les formes solubles et membranaires, tandis que le TNF-R2 se lie principalement à la forme membranaire (235). Jusqu'à présent, la participation du TNF-R1 semble avoir un impact plus important sur la perte locale de cartilage articulaire que le TNF-R2. Cela ne change toutefois pas le fait que les deux récepteurs sont impliqués dans la transduction du signal après avoir été activés par le TNF $\alpha$  dans les processus survenant dans l'arthrose (236, 237). L'expression de TNF-R1 est également augmentée dans les cellules FLS (238, 239). L'effet du TNF- $\alpha$  coïncide, dans la plupart des cas, avec l'action de l'IL-1 $\beta$  et, dans le cas de nombreux phénomènes se produisant au cours de l'arthrose, il existe une synergie marquée entre les deux cytokines (240). Cet effet est le résultat de l'activation du même groupe de voies de signalisation intracellulaires, ce qui déclenche à son tour des effets similaires qui augmentent l'inflammation et le catabolisme dans les tissus articulaires (220, 241).

Le TNF- $\alpha$  affecte le blocage de la synthèse des protéoglycanes dans les chondrocytes, des protéines liant les protéoglycanes et du collagène de type II (242, 243). Les chondrocytes activés produisent également MMP-1, MMP-3, MMP-13 et ADAMTS-4



(225, 244, 245). Comme décrit précédemment, il existe une induction de l'apoptose des chondrocytes qui supprime toute possibilité de régénération du cartilage (227, 228, 246). Un impact évident des TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  sur la réduction de l'efficacité de la chaîne respiratoire a également été observé, d'où la diminution de l'ATP produit dans les mitochondries situées dans les chondrocytes; de plus, le potentiel de la membrane mitochondriale diminue (247).

Le TNF- $\alpha$  est responsable de la synthèse accrue de, par exemple, IL-6, IL-8 et VEGF (248, 249, 250). De plus, comme décrit ci-dessus, IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  induisent la production d'iNOS, COX-2 et PGE2 synthase, augmentant ainsi les quantités de leurs produits (251, 252, 353).

### **7.3.1.3 L'interleukine-6 (IL-6)**

L'interleukine-6 (IL-6) est considérée comme une cytokine qui active fortement le système immunitaire et améliore la réponse inflammatoire, bien que, compte tenu de certains de ses effets, elle puisse être classée dans les interactions anti-inflammatoires. La production d'IL-6 dans les tissus de l'articulation arthrosique se fait généralement en réponse à IL-1 $\beta$  et au TNF- $\alpha$  et est principalement secrétée par les chondrocytes, les ostéoblastes, les FLS, les macrophages et les adipocytes (248, 254, 255). L'augmentation de la concentration d'IL-6 est présente à la fois dans le liquide synovial et dans le sérum, et est positivement corrélée à l'intensité des lésions en imagerie par rayons X (256, 257).

L'effet de l'IL-6 sur le cartilage articulaire n'est pas différent de celui des autres cytokines et, en synergie avec celles-ci, entraîne une diminution de la production de collagène de type II et augmente la production d'enzymes du groupe des MMP (258, 2659). Il a également été constaté que ces effets peuvent être renforcés sous l'effet d'une blessure (260). L'IL-6 est considérée comme la cytokine clé, responsable de modifications de la couche de l'os sous-chondral (261, 262). Son effet repose en grande partie sur la formation d'ostéoclastes et donc de la résorption osseuse, tout en montrant une synergie avec l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (261, 263).

Les ostéoblastes stimulés par l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 en deviennent une source et peuvent également produire des MMP en affectant négativement le cartilage situé à

proximité de celui-ci (264, 265). En analysant des tests sur des modèles animaux, on peut constater que l'IL-6 peut avoir un effet différent dans certaines situations. Une expérience réalisée sur des souris dépourvues du gène de l'IL-6 a montré qu'elles avaient tendance à développer des modifications dégénératives beaucoup plus avancées que les souris saines (266). Au cours d'une autre expérience, il a également été démontré, chez des souris dépourvues du gène de l'IL-6, que l'injection intra-articulaire d'IL-6 réduisait la perte de protéoglycanes dans la phase aiguë de l'inflammation articulaire chronique et induisait la formation d'ostéophytes (267).

#### **7.3.1.4 L'interleukine-15 (IL-15)**

L'interleukine-15 (IL-15) est une glycoprotéine. Son action repose principalement sur la stimulation de la différenciation et de la prolifération des cellules T et NK (268). C'est l'une des cytokines les mieux documentées impliquées dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde (PR) (269, 270). Lors de l'analyse de l'implication de l'IL-15 dans la pathogenèse de l'arthrose, son augmentation de concentration a été constatée dans le liquide synovial aux premiers stades de la maladie (271). Il a également été démontré que l'augmentation du taux d'IL-15 dans le sérum était corrélée à la fois avec la sensation de douleur et la gravité des lésions sur l'image radiographique (272). Il a également été noté que sa présence pouvait stimuler la sécrétion de certains types de métalloprotéinases du groupe des MMP (271).

#### **7.3.1.5 L'interleukine-17 (IL-17)**

L'interleukines-17 (IL-17) est une cytokine à effet inflammatoire qui attire de plus en plus l'attention des chercheurs pour sa participation à la pathogenèse de l'arthrose. Il est composé de six membres (IL-17A-F) pouvant interagir via cinq types de récepteurs (IL-17RA-E) (273, 274). La source d'IL-17 est principalement constituée de cellules T CD4<sup>+</sup> et de mastocytes infiltrant la membrane synoviale et l'ensemble de l'articulation par les vaisseaux sanguins (275, 276). Les principales cellules de l'articulation touchées par l'IL-17 sont les chondrocytes et les FLS présentant l'expression de l'IL-17R à leur surface (277). De plus, des études ont mis en évidence une réponse immunitaire cellulaire directe de ces cellules T contre les antigènes membranaires des chondrocytes et des fibroblastes au cours

de l'arthrose (278). Le taux d'IL-17 mesuré dans le sérum et dans le liquide synovial des patients est élevé et montre une corrélation positive avec l'image radiographique des lésions dans l'arthrose (279).

Il a été démontré que l'IL-17 inhibe la synthèse des protéoglycanes par les chondrocytes et favorise la production d'enzymes du groupe des MMP (280, 281). En outre, l'IL-17 influence la sécrétion d'autres cytokines et composés affectant la dégradation du cartilage, tels que l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'IL-6, le NO et la PGE2 (282, 283). L'effet de l'IL-17 sur la sécrétion de VEGF par les chondrocytes et les FLS est également caractéristique ; elle favorise le développement excessif d'un réseau de vaisseaux sanguins au sein de la membrane synoviale, conduisant à son hypertrophie (250, 277). Récemment, il a également été confirmé que le polymorphisme du gène IL-17A G-197A dans certaines populations pouvait être corrélé à la susceptibilité du développement de l'arthrose (284).

#### **7.3.1.6 L'interleukine-18 (IL-18)**

L'interleukine 18 (IL-18) est un autre représentant de la famille des IL-1F (206). La production d'IL-18 dans l'articulation est déterminée par les chondrocytes, les ostéoblastes, les FLS et les macrophages (285, 286). Son augmentation de concentration est évidente dans le liquide synovial, la synoviale, le cartilage et le sérum, et montre une corrélation positive avec le degré observé de gravité de la maladie sur les images radiographiques (287, 288).

L'effet de l'IL-18 est médié par le récepteur de l'IL-18R qui porte une similitude structurelle et fonctionnelle avec l'IL-1R. Des études ont montré que le polymorphisme des gènes codant, à la fois pour IL-18R et pour l'interleukine IL-18 chez certaines variantes, pouvait prédéterminer le développement de l'arthrose et la dégénérescence discale lombaire (LDD) (289, 290). L'IL-18 affecte les chondrocytes en induisant la régulation positive d'IL-18R $\alpha$  à leur surface et en stimulant la synthèse excessive des métalloprotéinases MMP-1, MMP-3 et MMP-13 (291). En plus d'augmenter la concentration des enzymes dégradant le cartilage, il existe une inhibition de la production de protéoglycanes, d'aggrécane et de collagène de type II. De plus, les chondrocytes présentent des modifications morphologiques typiques des cellules entrant dans l'apoptose (292, 293).

L'IL-18 affecte les chondrocytes et les cellules synoviales, augmentant la production de divers composés et enzymes, tels que l'IL-18 de manière autocrine, IL-6, iNOS, PGE2, COX-2 et VEGF (285, 294, 295).

### 7.3.2 Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

#### 7.3.2.1 Définition et sources de ROS

Les ROS sont des radicaux libres contenant des molécules d'oxygène, notamment un radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ), du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), un superoxyde anion ( $\text{O}_2^\cdot^-$ ), de l'oxyde nitrique ( $\text{NO}$ ) et un ion hypochlorite ( $\text{OCl}^-$ ) (Figure 7). La présence d'électrons non appariés dans la couche de valence fait en sorte que les ROS sont de courtes durées, instables et hautement réactifs afin de parvenir à la stabilité (296). Les principaux sites de génération de ROS comprennent les mitochondries (par phosphorylation oxydative), des molécules non liées aux mitochondries, la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH) et la xanthine oxydase (XO) (297).

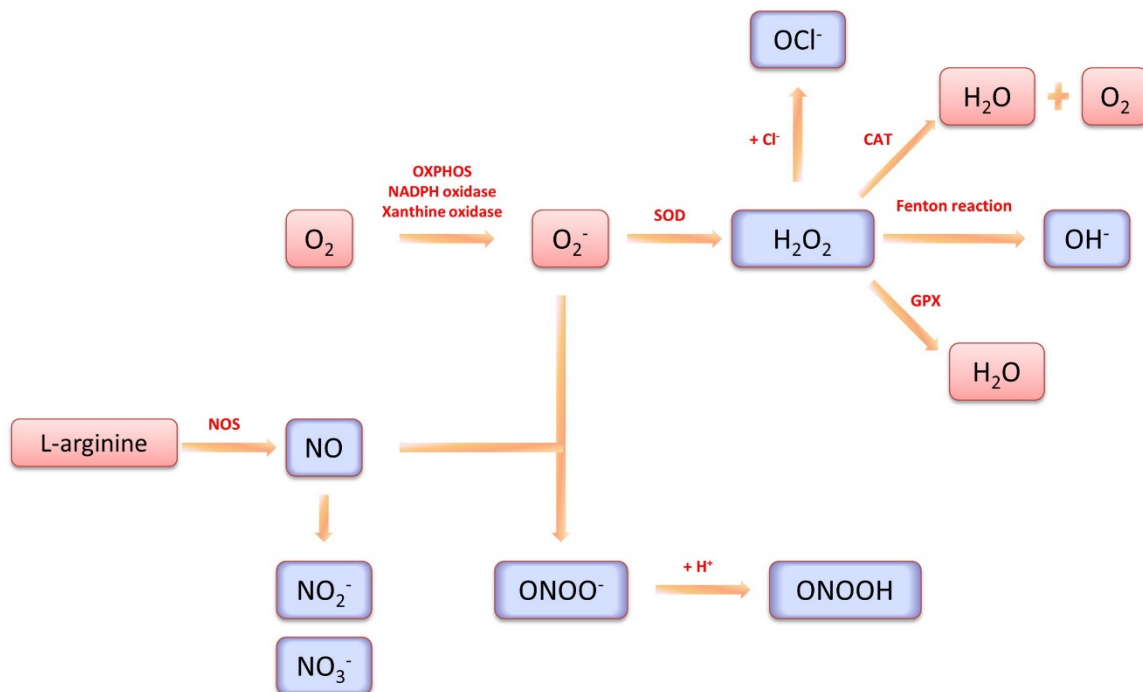


Figure 7: Production d'espèces réactives de l'oxygène impliquées dans la pathogenèse de l'arthrose.

CAT, catalase; Cl, chlore; GPX, le glutathion peroxydé; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxyde d'hydrogène; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; NO, oxyde nitrique; NOS, oxyde nitrique synthase; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, ion nitrite; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ion nitrate; OCl<sup>-</sup>, ion hypochlorite; OH<sup>·</sup>, radical hydroxyle; ONOOH, acide peroxy-nitrique; ONOO<sup>-</sup>, peroxy-nitrite; OXPHOS, phosphorylation oxydative; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, anion superoxyde; SOD, superoxyde dismutase. (Référence : 332)

Des mécanismes extensifs permettant de piéger les ROS ont été mis au point chez des espèces utilisant l'oxygène pour la production d'énergie. Ce système antioxydant comprend des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), le glutathion peroxydase (GPX), le glutathion (GSH), la NADPH ubiquinone oxydoréductase (NQO1), la paraoxonase (PON), l'acide ascorbique (vitamine C), l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) et les carotinoïdes (298, 299). Ils réagissent spontanément et récupèrent de nombreuses formes de ROS, maintenant ainsi le milieu redox intracellulaire (300). Le stress oxydatif a été défini comme une perturbation de l'équilibre entre la production de ROS et des défenses antioxydantes, qui entraînent des dommages macromoléculaires et une perturbation de la signalisation redox (301, 302).

### 7.3.2.2 Production de ROS dans les chondrocytes

Les ROS sont produits en faible concentration dans les chondrocytes articulaires, principalement par la NADPH oxydase. Ils sont des acteurs essentiels dans les mécanismes de signalisation intracellulaire qui contribuent au maintien de l'homéostasie du cartilage lors de la modulation de l'apoptose des chondrocytes, de l'expression des gènes et de la synthèse de la MEC, ainsi que de la production des cytokines (303, 304, 305, 306).

La production de ROS et le stress oxydatif ont été observés chez des patients atteints d'arthrose (307, 308, 309). Le cartilage arthrosique a significativement plus de dommages à l'ADN induit par les ROS que le cartilage normal, et ces dommages sont médiés par l'interleukine-1 (310). Les preuves de l'implication des ROS dans la dégradation du cartilage proviennent de la présence de produits de peroxydation lipidique, comme les lipoprotéines de basse densité oxydées (ox-LDL), les nitrites, la nitrotyrosine et les produits nitrés dans les fluides biologiques et le cartilage des patients souffrant d'arthrite,

et chez les modèles d'animaux d'arthrose (306, 311, 312, 313). Au contraire, les enzymes antioxydantes telles que la SOD, la CAT, la GPX et la PON1 sont diminuées chez les patients souffrant d'arthrose, ce qui confirme le rôle du stress oxydatif dans la pathogenèse de l'arthrose (308, 309, 314, 315).

Hiran *et al.* ont démontré que les chondrocytes articulaires porcins peuvent libérer des ROS en utilisant le complexe de type NADPH oxydase (316). La NADPH oxydase exprimée par les chondrocytes est la principale enzyme responsable de la formation de ROS dans le liquide synovial. Elle contribue à augmenter le stress oxydatif dans l'articulation et à favoriser la dégradation progressive du cartilage qui accompagne l'arthrose (317, 318).

iNOS est l'enzyme responsable de la production de NO. Elle est principalement exprimée dans les chondrocytes humains (319) et son expression est régulée positivement par des cytokines inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-17, le TNF- $\alpha$ , l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), le lipopolysaccharide (LPS) (320). La régulation de l'expression d'iNOS par IL-1 $\beta$  est médiée par le facteur nucléaire de transcription NF- $\kappa$ B (310). Plus spécifiquement, IL-1 $\beta$  entraîne la formation et la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau, où il se lie à des séquences spécifiques de la région promotrice du gène iNOS (321, 322). L'IL-17 stimule l'expression d'iNOS et la production de NO dans les chondrocytes par l'activation des voies de signalisation MAPK p38, MAPK p44 / 42 et NF- $\kappa$ B, qui augmentent l'expression de l'ARNm d'iNOS (323, 324). Les chondrocytes du cartilage arthrosique surexpriment l'iNOS, en particulier dans la zone superficielle, ce qui suggère que ces tissus produisent activement du NO (325, 326).

La surexpression de la NOS dans divers tissus inflammatoires suggère que la modulation de la synthèse et de l'action du NO pourrait constituer un nouveau traitement pour de nombreuses affections inflammatoires et auto-immunes.

### **7.3.2.3 Fonctions de la ROS dans le cartilage articulaire**

Dans les situations pathologiques comme l'arthrose, la tension de l'oxygène dans le liquide synovial est soumise à des fluctuations résultant du phénomène d'ischémie-reperfusion, d'une accélération pathologique du métabolisme tissulaire et de contraintes

anormales durables sur l'articulation (327). En réponse à des variations partielles de pression en oxygène, à des contraintes mécaniques (328, 329) et à des médiateurs inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , ox-LDL, LPS, IL-17), les chondrocytes produisent des taux anormaux de ROS via le NADPH oxydase, NOS et XO, principalement NO et O $_2^-$  qui génèrent d'autres radicaux tels que ONOO $^-$  et H $_2$ O $_2$  (303, 316). La réaction chimique entre O $_2^-$  et NO contribue à la formation de ONOO $^-$ , qui déclenche les dommages oxydatifs des protéines cellulaires, des lipides oxydants, des protéines, des glucides et de l'ADN dans le cartilage articulaire humain (330, 331).

Dans des conditions pathologiques, les ROS surproduites jouent le rôle de seconds messagers et contribuent à la dégradation du cartilage en inhibant la synthèse de la matrice, la migration cellulaire et la bioactivité des facteurs de croissance. Toutes en dégradant directement les composants de la matrice, en activant les MMP et en induisant la mort cellulaire (Figure 8).

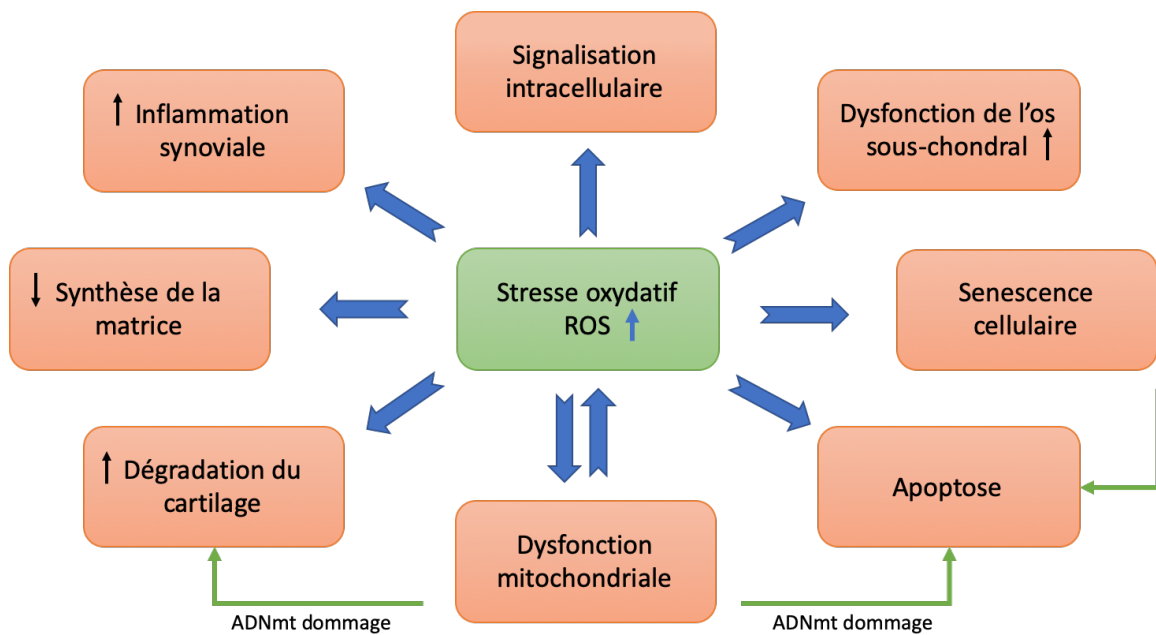


Figure 8: Mécanismes liés au stress oxydatif de la pathogenèse de l'arthrose. ADNmt, ADN mitochondrial (Adapté de la référence 332). (Autorisation demandée)

#### 7.3.2.4 ROS dans la signalisation intracellulaire au cartilage arthrosique

Une augmentation du stress oxydatif conduit à la régulation positive de facteurs de transcription sensibles à l'oxydoréduction, comme NF- $\kappa$ B, qui contribuent aux altérations phénotypiques pro-inflammatoires dans les tissus arthrosiques, notamment l'induction de l'expression d'iNOS, IL-8 et cyclooxygénase-2 (COX-2). L'augmentation des niveaux de ROS inhibe la voie PI3K / Akt et active la voie MEK / ERK dans les chondrocytes arthrosiques ; l'équilibre de ces voies est important pour le processus inflammatoire, l'apparition et la progression de l'arthrose (333, 334).

Les ROS agissent comme des intermédiaires de signalisation dans l'activation de JNK par IL-1 et TNF- $\alpha$  dans les chondrocytes (335). Dans les chondrocytes articulaires bovins, le TNF- $\alpha$  et le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) induisent la production de ROS par le biais d'un complexe d'enzyme NADPH oxydase, entraînant une régulation positive de l'expression de c-fos (336). De la même manière, les ROS régulent l'induction par IL-1 $\beta$  de l'expression de c-fos et de MMP-1 dans les chondrocytes articulaires (337). Par l'intermédiaire des canaux ioniques de transport membranaire, les ROS agissent comme second messenger provoquant un événement de phosphorylation de la protéine et régulant ainsi le pH intracellulaire et l'homéostasie ionique (298).

De nombreuses études suggèrent que le NO favorise l'inflammation en augmentant la production de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , qui activent rapidement le NF- $\kappa$ B. NO augmente la production de prostaglandine E 2 (PGE 2) et réduit la synthèse d'antagoniste endogène des récepteurs de l'IL-1 (IL-1Ra) (338, 339). Des expériences *in vivo* utilisant un modèle OA chez le chien ont démontré que la stimulation des chondrocytes par NO est en partie responsable de la régulation ultérieure de la synthèse de l'IL-18, ainsi que de la synthèse de l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 (ICE), une caspase nécessaire à la maturation d'IL-1 $\beta$  et IL-18 (340). NO augmente l'activité enzymatique de COX-2 (341) puisque ONOO<sup>-</sup> active COX-2 peroxydase (342). Il a été démontré que, dans les cellules souches mésenchymateuses différenciées chondro-géniquement, le collagène II modifié au peroxy-nitrite conduit à la phosphorylation des MAPK et à l'activation de NF- $\kappa$ B, à la régulation positive de l'iNOS et à la synthèse de NO (343). Cependant, dans certaines



circonstances, le NO peut avoir des actions anti-inflammatoires, car il peut réduire la production de PGE<sub>2</sub>, IL-6 et IL-8 dans les chondrocytes (344) et supprimer la production d'O<sub>2</sub> – par les neutrophiles par action directe sur la NADPH oxydase (345). Les oxydants dérivés du NO et du NO réagissent avec la phospholipase A<sub>2</sub> et inhibent la libération de l'acide arachidonique, substrat de la COX (346).

Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que les voies de signalisation intracellulaires sont très sensibles aux fluctuations intracellulaires des niveaux de ROS. En effet, l'activation de deux facteurs de transcription majeurs, NF-κB et AP-1, dépend de manière cruciale des taux de ROS intracellulaires (347).

### **7.3.3 Les prostaglandines**

Les prostaglandines jouent également un rôle important dans l'arthrose. Ils sont non seulement des initiateurs de l'inflammation, mais également des inhibiteurs de cette dernière. L'un des premiers effets des cytokines pro-inflammatoires est l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) qui clive les membranes cellulaires pour libérer l'acide arachidonique (Figure 9). La PLA<sub>2</sub> comprend trois grandes classes d'enzymes, chacune comprenant des sous-classes pouvant être régulées au cours de l'inflammation et du rétablissement (348). La cyclo-oxygénase 2 (COX-2) est également induite par les cytokines pro-inflammatoires. COX-2 est fortement régulée à la hausse au cours de l'inflammation et catalyse la conversion de l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub> (Figure 9). PGH<sub>2</sub> est le précurseur de nombreux eicosanoïdes (tels que la prostacycline et le thromboxane), mais l'accent sera mis sur seulement deux d'entre eux, PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub>. Le premier est la principale prostaglandine pro-inflammatoire et le dernier est le précurseur des prostaglandines associées au rétablissement.

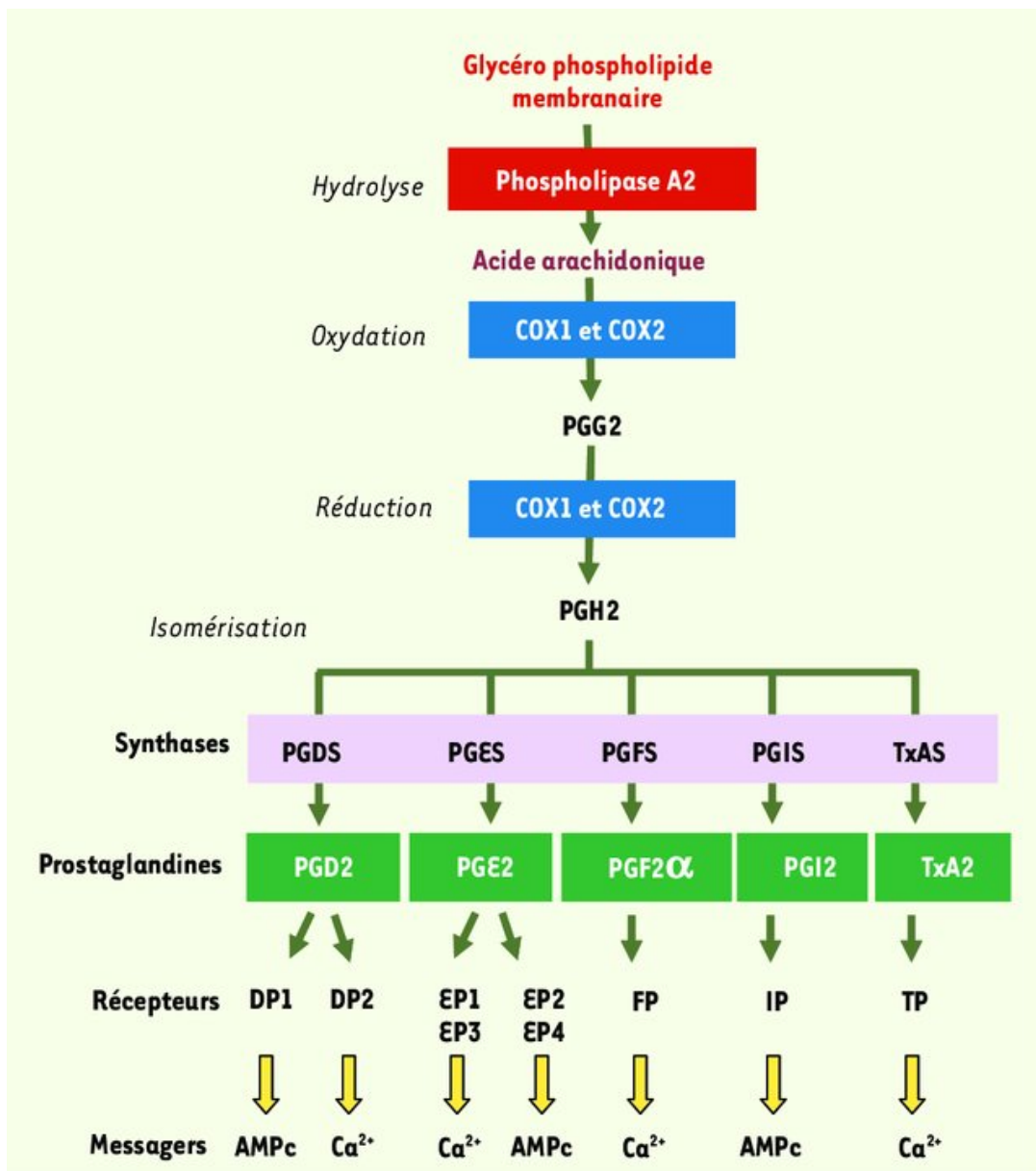


Figure 9: Synthèse et actions des prostaglandines.

L'acide arachidonique est métabolisé par les enzymes COX1 et COX2 en PGG2 puis en PGH2 au cours d'une réaction en deux étapes (oxydation et réduction). La prostaglandine PGH2, relativement instable, est convertie enzymatiquement par des synthases spécifiques : thromboxane (TxAS), PGE, PGF, PGD et PGI synthases, en l'un des cinq prostanoides : TxA2, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> et PGI<sub>2</sub>, respectivement. Chaque prostanoides interagit avec des membres distincts de la famille des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs (IP, DP1, DP2, EP 1-4, FP, IP et TP) activent ensuite différentes réponses et voies de signalisation (Référence: 349).

### 7.3.3.1 La PGE<sub>2</sub>

La prostaglandine E synthase-1 (mPGES-1) est l'enzyme principale, qui synthétise la PGE<sub>2</sub> à partir de la PGH<sub>2</sub>. Il a été prouvé que les niveaux d'ARNm et de protéines pour mPGES-1 étaient élevés dans l'arthrose par rapport au cartilage normal. Le traitement des chondrocytes avec de l'IL-1 $\beta$  ou du TNF $\alpha$  a augmenté l'expression de mPGES-1 de manière liée à la dose et au temps (350).

La PGE<sub>2</sub> est fortement exprimée dans l'arthrite (351). Pour comprendre le mécanisme par lequel les prostaglandines pourraient moduler la dégradation du cartilage induite par l'arthrite, McCoy et ses collaborateurs ont étudié des souris dépourvues de chacun des quatre récepteurs connus de la PGE<sub>2</sub>, appelés récepteurs EP1-4. Dans cette étude la génération d'arthrite est induite par le collagène. La délétion des récepteurs EP1, EP2, EP3 n'a pas affecté le développement de l'arthrite, mais les souris Knock-out en récepteurs EP4 ont entraîné une absence de dégradation du cartilage dans l'arthrite induite par le collagène. Ainsi, la PGE<sub>2</sub> contribue en partie à la dégradation du cartilage en se liant au récepteur EP4 (352).

Les mécanismes exacts des actions de la PGE<sub>2</sub> conduisant à la dégradation du cartilage ne sont pas bien compris. Deux hypothèses principales sont toutefois proposées : la première est une diminution de la synthèse des glycosaminoglycanes (353); la seconde est une augmentation de la synthèse de MMP (354). Pelletier *et al.* ont montré que la synthèse de MMP-1 est dépendante de l'eicosanoïde dans les explants de membrane synoviale de l'arthrose humaine (354). De plus, l'activation et l'expression de la MMP-2 induite par l'IL-1 $\beta$  étaient dépendantes de la PGE<sub>2</sub> dans les chondrocytes humains (355). Enfin, les expressions de MMP et TIMP sont régulées par la PGE<sub>2</sub> dans les chondrocytes équins (356). Cependant, la PGE<sub>2</sub> a inhibé l'expression de la MMP-1 par la délétion de C / EB $\beta$  / NF-KB / MEKK1 dans les fibroblastes synoviaux (357) (Figure 10).

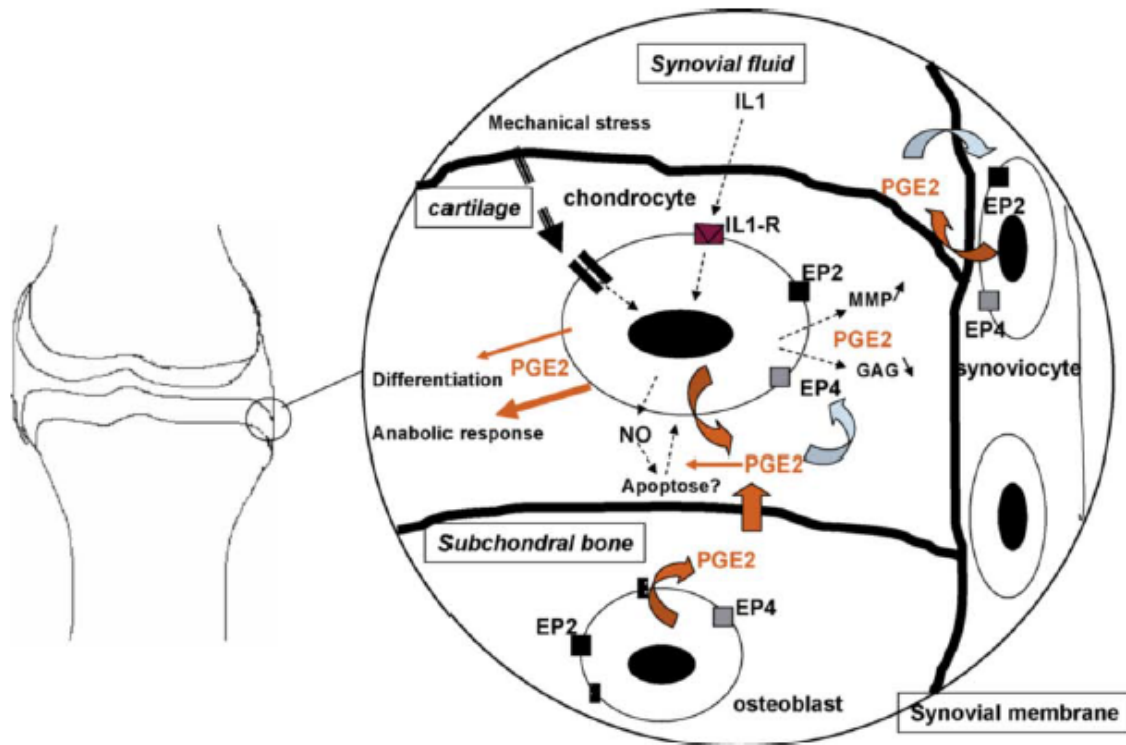


Figure 10: Rôle de la prostaglandine (PG) E<sub>2</sub> dans le processus d'arthrose.

Deux hypothèses d'action sont proposées pour PGE<sub>2</sub> dans OA : diminution de la synthèse des glycosaminoglycanes et augmentation des métalloprotéases matricielles (MMP) synthèse. La PGE<sub>2</sub> agit principalement par la liaison sur les EP2 et EP4 présentes sur les membranes des chondrocytes, synoviocytes et ostéoblastes (Référence : 356)

De plus, Notoya *et al.* ont montré que NO induit l'expression de la COX-2 par les voies des kinases ERK1 / 2 et p38, ce qui a pour résultat une augmentation de la libération de PGE<sub>2</sub> dans les chondrocytes arthrosiques humains (358). Par conséquent, la PGE<sub>2</sub> peut sensibiliser les chondrocytes à la mort cellulaire induite par le NO résultant d'un mécanisme autocrine-paracrine. Enfin, Miwa *et al.* ont montré que la PGE<sub>2</sub> induisait l'apoptose via la voie AMP-C dépendante dans les chondrocytes articulaires (359).

### 7.3.3.2 La PGD<sub>2</sub>

Le PGD<sub>2</sub> a été identifié par Hamberg en 1973 (360). Il existe deux PGD synthases : la PGD synthase hématopoïétique (H-PGDS) et la PGD synthase de type lipocaline (L-PGDS), qui métabolisent toutes deux PGH<sub>2</sub> en PGD<sub>2</sub>. La PGD<sub>2</sub> exerce des fonctions biologiques via deux récepteurs différents : le récepteur prostanoïde D (DP) et la molécule homologue du récepteur chimioattractant exprimée sur les cellules Th2 (CRTH2) (361). La L-PGDS est principalement exprimée dans les nerfs centraux et est bien connue pour induire le sommeil (362). H-PGDS est en revanche la principale source de PGD<sub>2</sub> dans les tissus périphériques et certains rapports suggèrent qu'il peut induire une inflammation allergique. Les cellules de la lignée hématopoïétique, principalement les mastocytes, expriment H-PGDS. La PGD<sub>2</sub> favorise la migration des cellules T via CRTH2 (363) et aggrave l'asthme (364). En revanche, certaines études suggèrent que la PGD<sub>2</sub> exerce des effets anti-inflammatoires via le DP1, tels que l'inhibition de la migration et de l'activation des neutrophiles, des basophiles, des cellules dendritiques et des cellules T (363).

À ce jour, on en sait peu sur l'expression et la régulation de L-PGDS et d'H-PGDS dans le cartilage. Dans notre laboratoire, nous avons étudié les expressions d'H-PGDS et de L-PGDS dans le cartilage sain et arthrosique pour mieux comprendre leurs effets.

Dans l'un des travaux déjà publiés, on a démontré la présence de la L-PGDS dans le cartilage. La cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  a régulé positivement l'expression de L-PGDS dans des chondrocytes en culture (365).

Dans le cartilage sain, l'immunomarquage du L-PGDS n'était localisé que dans quelques cellules des zones superficielles et moyennes du cartilage. En revanche, dans le cartilage arthrosique, le score cellulaire était significativement plus élevé, en particulier dans les zones cartilagineuses présentant des lésions importantes (fibrillation). Une augmentation de l'expression de L-PGDS a été décrite dans d'autres maladies telles que, la sclérose en plaques (366), le diabète (367), l'hypertension essentielle (368) et les maladies de Tay-Sachs et Sandhoff (369). Ainsi, l'expression de L-PGDS est régulée positivement dans de nombreuses pathologies.

L'expression accrue de L-PGDS dans les zones superficielles et moyennes du cartilage pourrait potentiellement être due à l'augmentation du niveau de cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  dans ces zones. En effet, il a été montré que l'IL-1 $\beta$ , qui joue un rôle essentiel dans l'initiation et la progression de l'arthrose, s'accumule dans ces zones (370,371). La production de PGD<sub>2</sub> est nettement accrue lors de la résolution de l'inflammation de la pleurésie induite par le carraghénane chez le rat, et la PGD<sub>2</sub> exogène réduit significativement les taux de neutrophiles dans les exsudats inflammatoires (372,373). Cipollone et ses collègues (374) ont examiné l'expression de la L-PGDS dans les artères athéroscléreuses et ont trouvé une expression plus faible de la L-PGDS, une expression plus élevée de la prostaglandine E synthase-1 microsomale (mPGES-1) dans des plaques symptomatiques, une expression plus élevée de la L-PGDS et une expression plus faible des mPGES -1 dans les asymptomatiques. Ceci suggère que l'équilibre entre le PGD<sub>2</sub> et la PGE<sub>2</sub> contribue à la pathologie de l'athérosclérose et qu'un passage à la synthèse du PGD<sub>2</sub> pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire. Ceci est corroboré par l'observation qu'une augmentation de la biosynthèse du PGD<sub>2</sub> est associée à une production réduite de PGE<sub>2</sub> dans plusieurs études *in vitro* (375,376).

Récemment, deux études distinctes ont démontré les propriétés anti-inflammatoires de la PGD<sub>2</sub> dans un modèle d'inflammation à poche d'air induite par des cristaux de monohydrate d'urate monosodique (377,378). De plus, les souris knock-out en H-PGDS ne parviennent pas à résoudre une réaction d'hypersensibilité de type retardée (379). En plus de ses effets anti-inflammatoires, il a été démontré que la PGD<sub>2</sub> induisait l'expression du collagène de type II et de l'aggrécane (380), empêchait l'apoptose (381) et inhibait l'induction de MMP-1 et de MMP-13 (382) dans les chondrocytes. Ensemble, ces données sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle la régulation à la hausse de l'expression de L-PGDS dans les chondrocytes pourrait faire partie d'un contre-contrôle négatif des réponses inflammatoires et cataboliques activées par IL-1 $\beta$  dans l'articulation.

La production de PGD<sub>2</sub> par les chondrocytes présente un intérêt particulier, car la PGD<sub>2</sub> est facilement convertie en 15d-PGJ<sub>2</sub>, un puissant agent antiarthritique (383). 15d-PGJ<sub>2</sub> régule négativement l'expression d'un certain nombre de médiateurs inflammatoires et cataboliques impliqués dans la pathogenèse de l'arthrose, y compris l'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,

iNOS, et MMP (383). De plus, de nombreuses études *in vivo* confirment l'effet protecteur de 15d-PGJ<sub>2</sub> et d'autres ligands de PPAR $\gamma$  dans des modèles animaux expérimentaux d'arthrose (384, 385). Ainsi, l'expression accrue de L-PGDS peut conduire à la production d'un ligand de PPAR $\gamma$  dans l'articulation. Contrairement aux PG classiques qui induisent leurs effets par la liaison aux récepteurs couplés aux protéines G à la surface des cellules, la 15d-PGJ<sub>2</sub> induit la plupart de ses effets par le biais du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . De plus, la PGD<sub>2</sub> peut directement exercer des effets protecteurs sur l'AP avant d'être métabolisée en 15d-PGJ<sub>2</sub>. En effet, il a été démontré que les chondrocytes humaines expriment DP1 et CRTH-2 fonctionnels et que PGD<sub>2</sub> régule négativement les expressions de MMP-1 et MMP-13 via l'activation de la voie DP1 (383, 385).

On a montré aussi que les voies MAPK JNK, p38, et NF-KB sont impliquées dans la régulation à la hausse de l'expression de L-PGDS par IL-1 $\beta$  (25). Nous avons également constaté que PGD<sub>2</sub> inhibe l'expression de la L-PGDS induite par l'IL-1 $\beta$ . Ces résultats suggèrent que PGD<sub>2</sub> pourrait exercer un mécanisme de rétroaction négative pour réguler négativement l'expression et l'activité de L-PGDS. Étant donné que les taux de L-PGDS sont élevés dans le cartilage arthrosique et que l'IL-1 $\beta$  a régulé à la hausse son expression dans les chondrocytes, il est possible que l'effet de l'IL-1 $\beta$  l'emporte sur celui de PGD<sub>2</sub> *in vivo* aux stades avancés de la maladie (25).

Dans notre travail, nous avons prouvé que la PGD<sub>2</sub> via DP1 joue un rôle protecteur contre la progression de l'arthrose.

## **8. Traitement actuel de l'arthrose et ses limites**

Comme mentionné ci-dessus, la dégénérescence du cartilage articulaire demeure le changement structurel le plus important observé dans l'arthrose, entraînant une douleur intense et une mobilité réduite (136, 386). La capacité innée de guérir le cartilage dégénéré est limitée par la nature du cartilage (non vascularisé), ce qui pose un défi important dans le traitement de l'arthrose. À l'heure actuelle, il n'y a pas de remède pour cette maladie et la plupart des traitements sont axés sur la gestion des symptômes, notamment les 3 principales modalités décrites à la Figure 11 (387). Il s'agit d'abord de thérapies physiques et professionnelles telles que la perte de poids ou l'usage d'appareils fonctionnels pour les

articulations portantes; deuxièmement, d'une intervention pharmacologique pour le traitement de la douleur par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les opioïdes, les viscosuppléments ou l'injection de corticostéroïdes; et troisièmement, d'une intervention chirurgicale telle qu'une arthroscopie, une microfracture ou un remplacement total de l'articulation.

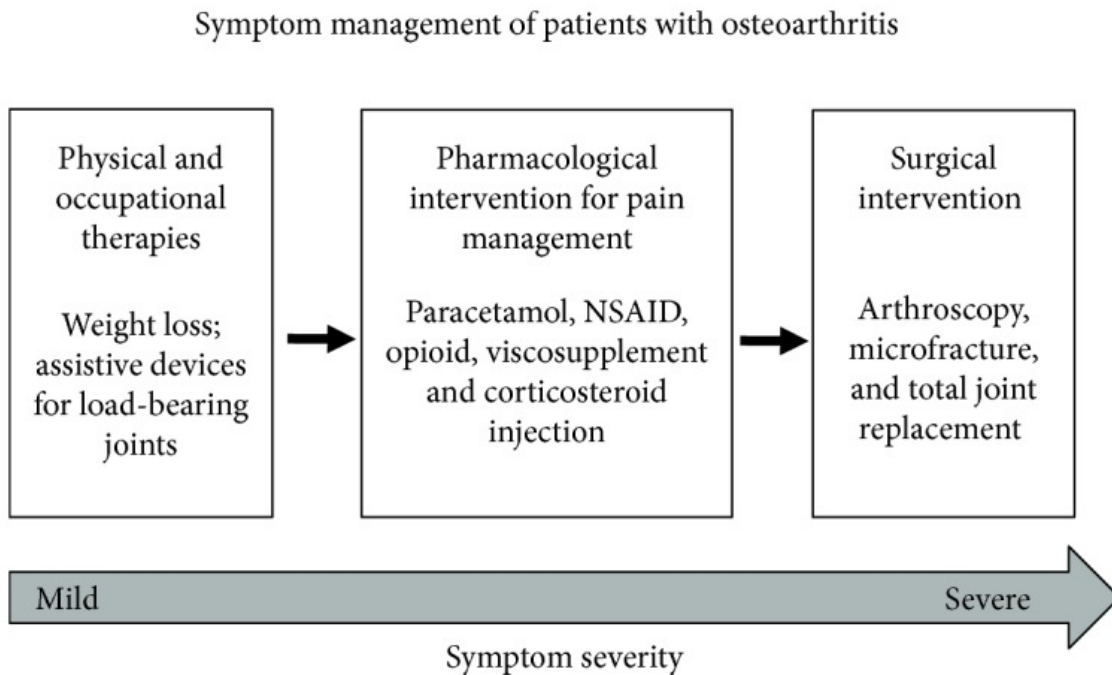


Figure 11: Modalités de traitement actuellement recommandées pour l'arthrose.

(Référence :387)

La *Fondation de l'arthrite* recommande aux patients souffrant d'arthrose de s'autoéduquer à la gestion de la maladie et encourage la perte de poids chez les patients en surpoids et obèses. Cela implique un régime et des exercices physiques pour réduire et gérer un poids santé. Cependant, en raison de la douleur et de la limitation physique résultant de l'arthrose, l'exercice est difficile à mettre en œuvre et à maintenir (387). La thérapie physique ciblée conjointe a montré un soulagement de la douleur et une amélioration de la fonction. Cependant, il n'y a pas d'amélioration à long terme. Un appareil fonctionnel est conçu pour fournir un support mécanique à la structure articulaire chez les patients atteints d'arthrose provoquant des instabilités dans l'articulation, et



également pour répartir la charge afin de soulager la douleur et d'améliorer la fonction, mais leur succès est limité (387).

Pour le moment, la stratégie principale de la gestion pharmacologique de l'arthrose est principalement de soulager la douleur, d'améliorer la fonction et de gérer le processus d'arthrose (388). Le traitement pharmacologique est utilisé chez les patients souffrant de douleur légère à modérée, et des médicaments tels que les AINS, les opioïdes et les corticostéroïdes sont utilisés en routine pour soulager la douleur. Cependant, il n'y a pas de soulagement à long terme et ces agents pharmacologiques ont des effets secondaires indésirables (389).

**L'acétaminophène** (paracétamol) était le traitement pharmacologique de première intention destiné au traitement de la douleur liée à l'arthrose légère à modérée. Cependant, cette recommandation est devenue peu concluante faute de preuves convaincantes (390). De plus, l'acétaminophène était associé à des risques d'effets indésirables gastro-intestinaux et à une défaillance multiorganique (391) avec un bénéfice minimal à court terme (392). Bien que moins efficace que les AINS et que certains patients aient des effets indésirables avec ces derniers, l'acétaminophène est toujours utilisé par certains patients. Il est cependant recommandé à des doses et à une durée de traitement conservatrices (390).

**Les anti-inflammatoires non stéroïdiens** (AINS) constituent une grande famille de médicaments, notamment les AINS oraux tels que l'ibuprofène, l'aspirine, le naproxène, les inhibiteurs de la COX-2 ainsi que les AINS topiques tels que le diclofénac sous forme de crème, de timbres, de gels ou de solutions. Les problèmes liés aux AINS par voie orale comprennent des effets indésirables sur le système gastro-intestinal (GI) et doivent être pris en association avec le produit de protection GI (393). En outre, ils sont associés à une toxicité potentielle, en particulier chez les patients âgés (387). Les inhibiteurs de la COX-2 par voie orale peuvent réduire les effets secondaires gastro-intestinaux, mais ils peuvent également entraîner d'autres effets indésirables comme le risque d'événements cardiovasculaires. L'utilisation d'AINS topiques élimine les effets indésirables gastro-intestinaux des AINS oraux, mais elles peuvent être moins efficace (394). En plus, ils ont été associés à des effets dermatologiques indésirables (395).

**Les opioïdes** peuvent être utilisés pour soulager la douleur lorsque les patients ne peuvent pas utiliser les AINS et l'acétaminophène en raison de leurs effets secondaires associés. Cependant, leurs efficacités à long terme sont limitées (395) et sont associées à des effets indésirables comme la dépression respiratoire, le trouble de la consommation d'opioïdes et la surdose (396).

Dans une méta-analyse d'essais, les patients sous traitement opioïde avaient quatre fois plus de risques d'abandonner l'étude, en raison d'effets indésirables que ceux sous placebo, et leur utilisation à long terme n'est pas recommandée (395). Il existe une vaste gamme de médicaments visant à soulager la douleur et à améliorer la qualité de vie des patients atteints d'arthrose, mais il n'existe à l'heure actuelle aucun agent pharmacologique capable de prévenir, d'arrêter ou d'inverser l'apparition de l'arthrose. Ces études mettent en évidence le manque de solutions pharmacologiques efficaces pour les personnes souffrant d'arthrose.

### **8.1 Intervention chirurgicale pour traiter l'arthrose**

L'intervention chirurgicale est recommandée lorsque la progression de l'arthrose a entraîné de graves lésions de l'articulation, une douleur intense et une détérioration de la fonction, et qui ne peuvent être gérées avec aucune autre option. L'option chirurgicale initiale visant à rétablir la stabilité structurelle, comme le débridement articulaire par arthrotomie ou arthroscopie pour retirer le cartilage détaché, des fragments de ménisque, le rasage du cartilage et l'élimination des ostéophytes, s'est avérée apporter un soulagement limité de la douleur et de la fonction (396). L'arthroscopie par les chirurgiens orthopédistes demeure la chirurgie la plus pratiquée dans le monde développé pour aider au mouvement mécanique du genou raide touché. Un essai clinique contrôlé en aveugle sur l'arthroscopie pour le débridement et le lavage avec un placebo a montré qu'aucun soulagement de la douleur n'était obtenu après l'intervention chirurgicale par rapport au placebo (397).

Le remplacement des articulations est considéré comme la dernière option offerte aux patients souffrant d'arthrose lorsque l'état atteint le stade le plus grave. Les interventions chirurgicales pour le remplacement de la hanche et des genoux sont extrêmement douloureuses et nécessitent une longue période de rééducation. En outre, les

arthroplasties totales du genou ont eu des conséquences néfastes telles qu'une embolie pulmonaire, des infections et des décès liés à une intervention chirurgicale dans certains cas (398).

## **8.2 Thérapie cellulaire et médecine régénératrice pour l'arthrose**

Plus récemment, de nombreuses techniques de régénération ont été utilisées, telles que la greffe de chondrocytes autologues (ACI) pour les lésions focales du cartilage, la microfracture et la mosaïcplastie. La technique ACI pour traiter les lésions cartilagineuses confinées implique la transplantation de chondrocytes prélevés sur du cartilage ne portant pas le poids du patient (399), mais ne traite pas l'arthrose généralisée. Cette méthode pose quelques problèmes, car elle provoque non seulement une morbidité au site donneur, mais également une dédifférenciation des chondrocytes dans le site transplanté, ce qui conduit à l'expression du collagène de type I plutôt que de celui de type II, ce qui peut entraîner un fibrocartilage plutôt que le cartilage de type hyalin (400). Une autre technique chirurgicale courante est la microfracture qui déclenche la migration des cellules de la moelle osseuse vers la surface articulaire en stimulant la réponse inflammatoire en perçant des trous dans la plaque sous-chondral au niveau du site du défaut chondral. Le but de cette technique est de fournir un environnement enrichi pour la régénération des tissus (401). Cependant, le tissu résultant est à nouveau un fibrocartilage contenant du collagène de type I ou un tissu cartilagineux à réparation hybride, et non le cartilage hyalin normal (collagène de type II). En outre, la prolifération osseuse sous-chondral observée (25 % à 49 %) pourrait limiter la durabilité et les résultats à long terme de la microfracture (402). Enfin, la procédure de mosaïcplastie est semblable à la technique ACI et implique l'utilisation de greffes ostéochondrales autologues. Toutefois, les résultats sont décevants et minimes, et n'offrent que des avantages à court terme (403).

Les informations ci-dessus démontrent que le traitement actuel de l'arthrose est uniquement axé sur la gestion des symptômes et qu'aucune de ces options ne permet de ralentir la progression de la maladie ni d'offrir un bénéfice à long terme. Par conséquent, il existe une demande médicale non satisfaite pour le traitement de l'arthrose qui peut arrêter la progression de la maladie et procurer un soulagement à long terme des symptômes de l'arthrose. La thérapie cellulaire a permis de lutter efficacement contre cette maladie

dégénérative débilite et peut apporter des bénéfices à long terme pour modifier la maladie. Des efforts énormes ont été déployés dans les études précliniques et maintenant dans les essais cliniques évaluant le potentiel de régénération des cellules souches adultes, en particulier des cellules souches mésenchymateuses (CSM), pour réparer les dommages structurels de l'articulation, la dégénérescence du cartilage et l'inflammation.

## CHAPITRE B : TRAVAUX RÉALISÉS

L'OA a longtemps été considérée comme un processus de vieillissement normal, d'où le terme maladie dégénérative des articulations. À ce jour, il n'y a aucun moyen d'éviter ou inverser ce processus.

Dans notre laboratoire, nous nous intéressons à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inflammation et la dégradation des tissus articulaires en vue de concevoir une médication appropriée pour prévenir et ralentir le développement de la maladie voir même l'arrêter. Bien que l'OA touche les différentes structures et tissus de l'articulation, nous nous sommes intéressés dans ce projet à étudier les changements dans les différentes composantes de l'articulation (l'os, membrane synoviale, cartilage), vu leur rôle central dans la maladie.

Dans notre laboratoire, Nous avons montré antérieurement que la  $PGD_2$  inhibe la production et l'expression de MMP-1 et MMP-13. Ces enzymes sont reconnues, avec ADAMTS, pour leur rôle dans la dégradation du cartilage. Nous avons également montré que la L-PGDS, enzyme responsable de la biosynthèse de la  $PGD_2$ , est exprimé dans le cartilage et que son niveau est plus élevé dans cartilage OA. La voie DP1/ L-PGDS joue un rôle très important dans la physiopathologie de l'OA. Cette voie est également impliquée dans l'inflammation et la douleur. Bien que le gène de DP1 et L-PGDS ont été caractérisés dans de nombreux types cellulaires, les mécanismes moléculaires impliqués dans sa régulation ne sont pas bien définis. Mon hypothèse est que la voie L-PGDS/  $PGD_2$ / DP1 joue un rôle protecteur dans l'OA.

Le fait que seuls des travaux in vitro on était réalisé jusqu'à Aujourd'hui, L'objectif de cette thèse est de mieux définir le rôle de ces deux enzymes DP1 et L-PGDS dans la pathogenèse de l'OA in-vivo. Pour cela on a utilisé deux modèles de souris: OA-associée à l'âge et OA due à une déstabilisation de l'articulation. De même, on a utilisé des cultures primaires de chondrocytes et des explants du cartilage provenant de souris KO. En plus, on a mis en évidence le rôle des différents métabolites de la prostaglandine D2, avec leurs rôle anti-inflammatoire dans l'OA (détaillé dans la discussion).

Les résultats découlant de ces études permettront une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la voie de DP1 / PGD2 / L-PGDS qui seront très utiles dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces traitements auront un impact, non seulement dans le traitement de l'OA, mais aussi dans le traitement d'autres pathologies musculosquelettiques et autres, associées à une dérégulation de l'expression de la DP1 ou de la L-PGDS.

## ARTICLES

### Article 1

**Objectif :** Le récepteur D 1 prostanöide (DP1) est un récepteur de la prostaglandine D2. Il joue un rôle important dans l'inflammation et le métabolisme du cartilage. Cependant, son rôle dans la pathogenèse de l'arthrose reste inconnu. Cette étude visait à explorer les rôles de DP1 dans le développement de l'arthrose dans les modèles murins et à évaluer l'efficacité d'un agoniste sélectif de DP1 dans le traitement de l'arthrose.

**Méthodes :** Le développement de l'arthrose associée au vieillissement et la déstabilisation du ménisque médian (DMM) ont été comparés entre les souris déficientes en DP1 (DP1 -/-) et de type sauvage (WT). La progression de l'arthrose a été évaluée par histologie, immunohistochimie et Microtomographie aux rayons X ( $\mu$ CT). Des explants de cartilage de souris DP1 -/- et WT ont été traités avec de l'interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) ex vivo, afin d'évaluer la dégradation des protéoglycanes. L'effet de l'administration intrapéritonéale de l'agoniste sélectif DP1 BW245C sur la progression de l'arthrose a été évalué chez des souris WT.

**Résultats :** Comparées aux souris WT, les souris DP1 -/- avaient exacerbé la dégradation du cartilage dans les deux modèles d'arthrose, ce qui était associé à une expression accrue de la métalloprotéinase matricielle 13 et d'ADAMTS-5. De plus, les souris DP1 -/- ont présenté des modifications améliorées de l'os sous-chondral. Des explants de cartilage provenant de souris DP1 -/- ont montré une dégradation accrue des protéoglycanes après traitement avec IL-1 $\alpha$ . L'injection intrapéritonéale de BW245C a atténué la gravité de la dégradation du cartilage induite par le DMM et des modifications osseuses chez les souris WT.

**Conclusion :** Ces résultats indiquent un rôle critique pour la signalisation DP1 dans la pathogenèse de l'arthrose. La modulation des fonctions de DP1 pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle pour le développement de nouveaux traitements de l'arthrose.

### **Contribution des auteurs :**

Yassine Ouhaddi : Planification et réalisation des expériences (figure 1, 2, 4, 6 B-C), analyse des données, correction de l'article.

Sarah-salwa Nebbaki: Réalisation des expériences (Figure 3A-B, 6 A, figure supplémentaire 2).

Hassan Afif : Planification et réalisation des expériences (figure 3C, 5, figure supplémentaire 1C), analyse des données.

Lauris Habouri : Réalisation des expériences (figure supplémentaire 1A-B).

Mohit Kapoor : Analyse des données, correction de l'article.

Bertrand Lussier : Réalisation des expériences (chirurgie des souris) et analyse des données.

Shuh Narumiya : Analyse des données.

Jean-Pierre Pelletier, Johanne Martel-Pelletier : Analyse des données et correction de l'article.

Mohamed Benderdour : Co-direction et analyse des données.

Hassan Fahmi : Planification, analyse des données, direction générale et rédaction de l'article.



## **Paper 1:**

### **Exacerbation of Aging-Associated and Instability-Induced Murine Osteoarthritis with Deletion of D Prostanoid Receptor 1, a Prostaglandin D2 Receptor.**

Yassine Ouhaddi <sup>1</sup>, Sarah-Salwa Nebbaki <sup>1</sup>, Lauris Habouri <sup>1</sup>, Hassan Afif <sup>1</sup>, Bertrand Lussier <sup>2</sup>, Mohit Kapoor <sup>3</sup>, Shuh Narumiya <sup>4</sup>, Jean-Pierre Pelletier <sup>1</sup>, Johanne Martel-Pelletier <sup>1</sup>, Mohamed Benderdour <sup>5</sup>, Hassan Fahmi <sup>1</sup>.

#### Author details

1. University of Montreal Hospital Research Center and University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.
2. University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.
3. The Toronto Western Research Institute, University Health Network, Toronto, Ontario, Canada.
4. Kyoto University, Kyoto, Japan.
5. Sacré-Coeur Hospital, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant MOP-130293), the Arthritis Society, and the Fonds de la Recherche du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

Direct correspondence to: Hassan Fahmi

Publié dans: *Arthritis Rheumatol.* 2017 Sep; 69(9) :1784-1795. doi: 10.1002/art.40160.  
Epub 2017 Aug 1.

## **Abstract**

### **Objective**

D prostanoid receptor 1 (DP1), a receptor for prostaglandin D2, plays important roles in inflammation and cartilage metabolism. However, its role in the pathogenesis of osteoarthritis (OA) remains unknown. This study was undertaken to explore the roles of DP1 in the development of OA in murine models and to evaluate the efficacy of a DP1 selective agonist in the treatment of OA.

### **Methods**

The development of aging-associated OA and destabilization of the medial meniscus (DMM)-induced OA was compared between DP1-deficient (DP1<sup>-/-</sup>) and wild-type (WT) mice. The progression of OA was assessed by histology, immunohistochemistry, and micro-computed tomography. Cartilage explants from DP1<sup>-/-</sup> and WT mice were treated with interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) ex vivo, to evaluate proteoglycan degradation. The effect of intraperitoneal administration of the DP1 selective agonist BW245C on OA progression was evaluated in WT mice.

### **Results**

Compared to WT mice, DP1<sup>-/-</sup> mice had exacerbated cartilage degradation in both models of OA, and this was associated with increased expression of matrix metalloproteinase 13 and ADAMTS-5. In addition, DP1<sup>-/-</sup> mice demonstrated enhanced subchondral bone changes. Cartilage explants from DP1<sup>-/-</sup> mice showed enhanced proteoglycan degradation following treatment with IL-1 $\alpha$ . Intraperitoneal injection of BW245C attenuated the severity of DMM-induced cartilage degradation and bony changes in WT mice.

### **Conclusion**

These findings indicate a critical role for DP1 signaling in OA pathogenesis. Modulation of the functions of DP1 may constitute a potential therapeutic target for the development of novel OA treatments.

## **INTRODUCTION:**

Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative disorder and a leading cause of physical disability (1), with a large socioeconomic cost (2). Clinical manifestations of OA may include pain, stiffness, and reduced joint motion. Pathologically, OA is characterized by progressive degeneration of the articular cartilage, increased expression of inflammatory and catabolic mediators, and subchondral bone remodeling (3). At present, there is no curative therapy available for OA and current treatment remains limited to symptomatic relief. A variety of risk factors, including joint injury, obesity, aging, and genetics, have been associated with OA (1); however, the pathophysiologic processes that contribute to the progressive nature of the disease remain elusive. A deeper understanding of the mechanisms underlying OA development will be instrumental in developing novel drugs for the prevention and treatment of OA.

Degradation of the cartilage extracellular matrix is a central feature of OA and is considered to be mediated by proteinases that degrade major structural components of the matrix, primarily type II collagen and aggrecan. Matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) is the principal protease responsible for type II collagen degradation, and MMP-13-deficient mice are protected against OA cartilage damage (4), whereas MMP-13-transgenic mice develop spontaneous OA-like cartilage damage (5). ADAMTS-5 is the main aggrecan-degrading proteinase in murine cartilage, and ADAMTS-5-deficient mice are protected from surgically induced OA (6) and from inflammatory arthritis (7).

Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) is a potent lipid mediator derived from arachidonic acid via cyclooxygenases and PGD<sub>2</sub> synthases. PGD<sub>2</sub> elicits its downstream effects by activating 2 plasma membrane receptors, D prostanoid receptor 1 (DP1) (8) and chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells (CRTH2), also known as DP2 (9). PGD<sub>2</sub> contributes to multiple physiologic and pathologic processes, including vasodilation (10), platelet aggregation (11), smooth muscle relaxation and contraction (12), sleep/wake regulation (13), mediation of allergic reactions (14), chemotaxis (9), and cell trafficking (15). PGD<sub>2</sub> has also been shown to modulate

inflammation, acting as either a proinflammatory or antiinflammatory mediator, depending on the pathologic condition and the affected tissue. Activation of DP1 receptors is primarily associated with antiinflammatory effects (16-27). In contrast, activation of DP2 is generally associated with proinflammatory effects (9, 25-33).

We have previously shown that DP1 is expressed in human cartilage and that the selective DP1 agonist BW245C inhibits interleukin-1 (IL-1)-induced expression of MMP-1 and MMP-13 in cultured chondrocytes (34), suggesting that DP1 may play a protective role in OA pathogenesis. To test this hypothesis, we investigated the effect of DP1 deletion on the course of aging-associated spontaneous OA and instability-induced OA in 2 murine models. We also examined the effect of the DP1 selective agonist BW245C on the progression of instability-induced OA in wild-type (WT) mice. The results of this study demonstrate that DP1 deletion exacerbated cartilage degradation in both the aging-associated and instability-induced OA models. The effect of DP1 deficiency was associated with increased expression of MMP-13 and ADAMTS-5. We also showed that OA-like bony changes were more pronounced in DP1<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice. Furthermore, we demonstrated that administration of a DP1 agonist attenuated the severity of OA-like features. Taken together, these findings suggest that targeting DP1 could represent a promising new avenue in the development of novel therapies for OA.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Mice**

All animal experiments were approved by the Institutional Animal Protection Committee of the University of Montreal Hospital Research Centre. DP1<sup>-/-</sup> mice were generated as described previously (14). In those mice, the DP1 gene was disrupted by insertion of a neomycin resistance gene into the first coding exon (exon 2) between the Nhe I and Xba I restriction sites. This modification leads to complete loss of functional DP1 protein in homozygous animals. DP1<sup>-/-</sup> mice were backcrossed onto the C57BL/6 background for more than 10 generations. Heterozygous mice were intercrossed to obtain the DP1<sup>-/-</sup> mice and WT littermates used in the experiments. Genotypes were identified by polymerase chain reaction (PCR) analyses of tail biopsy DNA extract.

Mice were maintained under standard pathogen-free conditions at a constant temperature of 21°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) and a 12-hour light/dark cycle, with water and a pelleted standard normal diet (catalog no. 2918; Teklad Global, Harlan Laboratories) made available ad libitum. Mice were housed 2–5 per cage in filter-top cages ( $\sim 38 \times 20 \times 15$  cm in dimension) containing hardwood chip (Beta Chip; Northeastern Products) or Teklad 7089 diamond soft cellulose bedding (Harlan Laboratories) for the studies of aging-associated OA and destabilization of the medial meniscus (DMM)–induced OA, respectively. Cotton nestlets and hard plastic tubes were placed in each cage for environmental enrichment.

### **Aging-associated and instability-induced OA models**

In the aging-associated model of OA, groups of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice were killed at ages 3, 9, and 15 months. Knees were harvested and subjected to histologic, immunohistochemical, and micro-computed tomography (micro-CT) analyses.

For the DMM model of OA, arthritis was induced in the right knee joints of 10-week-old male WT and DP1<sup>-/-</sup> mice, as described previously (35). Briefly, animals were anesthetized and the right knee joint was destabilized by transection of the anterior attachment of the medial meniscotibial ligament (MMTL). The sham operation involved the same surgery, except that the MMTL was visualized but not transected. Buprenorphine was provided perioperatively at 0.09 mg/kg every 10–12 hours for 72 hours. Groups of mice were killed at 2, 4, and 8 weeks post-DMM surgery, and the joints were evaluated for the development of OA. Only male mice were used in vivo in this study, because male mice develop more prominent features of the disease (36). Nine mice were excluded from this study due to spontaneous death ( $n = 3$ ), anesthesia-associated death ( $n = 2$ ), postoperative complications ( $n = 2$ ), or incomplete decalcification ( $n = 2$ ).

### **Histologic analysis of cartilage**

The harvested knee joints were fixed in TissuFix (Chaptec), decalcified in RDO Rapid Decalcifier (Apex Engineering), and embedded in paraffin. Coronal sections (5  $\mu\text{m}$ ) were obtained through the entire joint at 80- $\mu\text{m}$  intervals and stained with Safranin O–fast green (Sigma-Aldrich). Eight sections of joint tissue from each mouse were graded by 2 scorers (YO and HF) who were blinded with regard to the origin of the specimens, in accordance

with the recommendations of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) guidelines (37). The 4 quadrants (medial tibial plateau, medial femoral condyle, lateral tibial plateau, and lateral femoral condyle) of the knee were assessed and the scores were added to obtain the summed histologic score of OA severity.

### **Immunohistochemical analysis**

Knee joints were fixed in TissuFix, decalcified in 10% EDTA for 14 days at 4°C, and embedded in paraffin. Immunohistochemical analysis was performed as described previously (38), (39) (for further details, see Supplementary Methods, available on the Arthritis & Rheumatology website at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>).

### **Isolation of primary chondrocytes and measurement of cAMP levels**

Primary epiphyseal chondrocytes were isolated from 5–6-day-old mice, as previously reported (40). A detailed description of the isolation of the primary chondrocytes can be found in the Supplementary Methods (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>).

### **RNA extraction and real-time reverse transcription–PCR (RT-PCR)**

Articular cartilage was dissected from the surfaces of the tibial plateaus and femoral condyles using a scalpel blade under a dissecting microscope. Cartilage pieces from 5 separate mouse joints (for the aging studies) or 8 separate mouse joints (for the DMM studies) were pooled for each sample of RNA, and 3 samples were used per experimental group. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed and amplified using a QuantiTect RT-PCR kit (Qiagen) on a Rotor Gene 3000 real-time PCR system (Corbett Research), according to the manufacturer's protocol. Relative messenger RNA (mRNA) expression was determined using the  $\Delta\Delta C_t$  method, and GAPDH was used as the housekeeping gene. The primer efficiencies were similar for the target and GAPDH genes (a list of all primer sequences is available from the corresponding author upon request).

### **Culture of cartilage explants**

Femoral heads from 3–4-week-old WT and DP1<sup>-/-</sup> mice were cultured as explants (4 femoral heads per well) in 48-well plates at 37°C in 400 µl of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing antibiotics and 10% fetal calf serum for 48 hours. The explants were then washed in serum-free DMEM and cultured for an additional 72 hours in serum-free DMEM, with or without 10 ng/ml mouse IL-1 $\alpha$ . Conditioned medium was collected at the end of the culture period, and proteoglycan degradation was assessed by measuring the levels of sulfated glycosaminoglycan (GAG) released into the culture medium, using dimethylmethylene blue with chondroitin sulfate as a standard (41). Results are expressed as µg of GAG released/mg cartilage.

### **Micro-CT analysis of bone**

The knee joints were scanned using a Skyscan 1176 micro-CT scanner at 50 KV and 149 µA, with a pixel size of 9 µm and a 0.5-mm aluminum filter. Data were recorded at every 3-degree rotation step through 180 degrees. Image slices were reconstructed using NRecon software (version 1.6.3.2; SkyScan). The region of interest included the area between the epiphyseal growth plate and the articular cartilage. Using SkyScan CT Analyzer software, the following bone morphometric parameters were assessed: trabecular bone volume fraction (bone volume/total volume [BV/TV]), trabecular thickness (TbTh), trabecular separation (TbSp), and trabecular number (TbN). CTVox software (SkyScan) was used to create 3-dimensional (3-D) images.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software, version 6.0. Comparison between groups was performed using the Mann-Whitney U test or Student's t-test. P values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### **Acceleration of cartilage degeneration in DP1-deficient mice in the aging-associated and DMM-induced OA models**

We first examined the expression of DP1 and CRTH2 mRNA in articular cartilage of WT mice at 8 weeks post-DMM surgery (n = 3 replicate experiments, with 8 joints pooled per replicate) and at 9 months of age (n = 3 replicate experiments, with 5 joints pooled per replicate). Expression of mRNA was evaluated as a percentage relative to the values in control animals (sham-operated or 3-month-old mice) after normalization to the values for the GAPDH internal control gene. We found that the level of DP1 mRNA was significantly lower in mice at 8 weeks post-DMM and mice at age 9 months (see results in Supplementary Figures 1A and B, available on the Arthritis & Rheumatology web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>). In contrast, the expression level of CRTH2 mRNA remained unchanged. These data suggest that decreased expression of DP1 in OA chondrocytes might be involved in the pathophysiology of OA. The findings prompted us to analyze the effect of functional DP1 deletion on the development of OA-like changes in mice. In these studies, the effective deletion of the functional DP1 receptor was validated by assessing its ability to mediate cAMP production, a functional readout for DP1 activation. The results revealed that treatment with either PGD2 or BW245C enhanced the levels of cAMP in cultured chondrocytes from WT mice, whereas in DP1<sup>-/-</sup> mice, the levels of cAMP remained unchanged following treatment with these 2 agonists. Treatment with other agonists that induce cAMP production, such as PGE2, increased the cAMP levels in both WT and DP1<sup>-/-</sup> mouse chondrocytes (see Supplementary Figure 1C, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>). Thus, the results confirmed the loss of functional DP1 activity in chondrocytes from DP1<sup>-/-</sup> mice.

To investigate whether DP1 deficiency affects the expression of the genes for types I and II collagen and aggrecan, we analyzed their mRNA levels in primary chondrocytes isolated from DP1<sup>-/-</sup> and WT mice. Real-time RT-PCR analysis showed no significant differences in the mRNA expression levels for any of these genes between DP1<sup>-/-</sup> and WT mouse chondrocytes (see Supplementary Figure



1D, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>), indicating that the deletion of DP1 does not alter the expression of the key components of cartilage matrix in cultured chondrocytes.

To define the role of DP1 in the development of OA, we next compared histologic features in the knee joints of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at ages 3, 9, and 15 months (n = 6 mice per genotype at each time point). Knee joints from WT mice showed no anomalies in the cartilage until age 15 months, when only a mild decrease in Safranin O staining and small fibrillations were seen. In contrast, DP1<sup>-/-</sup> mouse joints showed a decrease in Safranin O staining accompanied by mild fibrillations as early as age 9 months, and almost complete loss of the articular cartilage at age 15 months (Figures 1A and B).

We also evaluated the condition of the articular cartilage of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice using the OARSI histologic scoring system (37). At age 3 months, there was no difference in the summed histologic score for OA severity between DP1<sup>-/-</sup> mice and their WT littermates. At ages 9 months and 15 months, the summed score for the articular cartilage of DP1<sup>-/-</sup> mice was significantly higher than that for the articular cartilage of WT littermates at the same age (Figure 1C). These data suggest that DP1 deficiency accelerates the progression of spontaneous aging-related cartilage degeneration.

We next examined the susceptibility of 10-week-old DP1<sup>-/-</sup> mice and their WT littermates to DMM-induced OA. DMM surgery was performed and the knee joints were harvested at 2 weeks (n = 8 WT mice and 8 DP1<sup>-/-</sup> mice), 4 weeks (n = 7 WT mice and 6 DP1<sup>-/-</sup> mice), and 8 weeks (n = 8 WT mice and 8 DP1<sup>-/-</sup> mice) postsurgery. Histologic analysis of the knee joints showed that features of cartilage degeneration appeared at 2 weeks after DMM surgery and worsened at 4 and 8 weeks (Figures 2A and B). The changes were, however, significantly more severe in DP1<sup>-/-</sup> mice.

Quantification by the OARSI scoring system (37) confirmed the severity of cartilage lesions observed in DP1<sup>-/-</sup> mice at all postsurgery time points analyzed (Figure 2C). Taken together, these data indicate that DP1 deletion also accelerates cartilage destruction in the DMM model.

As shown in Figures 2A and B, osteophytes were detected at the medial edge of the joints of both WT and DP1<sup>-/-</sup> mice. The time course of osteophyte formation and the size of the osteophytes in DP1<sup>-/-</sup> mice were virtually similar to those in WT mice.

## **Up-regulated expression of cartilage degradation enzymes in the presence of DP1 deletion**

To explore the mechanisms underlying the exacerbation of cartilage damage in DP1<sup>-/-</sup> mice, we analyzed the expression of key mediators of cartilage degradation, i.e., expression of ADAMTS-5 and MMP-13 (5–7), in DP1<sup>-/-</sup> mice and their WT littermates at ages 3 months and 9 months (n = 5 mice per genotype per time point). At age 3 months, there was little or no expression of MMP-13 or ADAMTS-5 in the knee joints of either WT or DP1<sup>-/-</sup> mice (Figures 3A and B). At age 9 months, the expression levels of both enzymes remained barely detectable in the knee joints of WT mice, but the levels of both enzymes were dramatically elevated in the knee joints of DP1<sup>-/-</sup> mice (Figures 3A and B).

We also analyzed the expression of MMP-13 and ADAMTS-5 in the knee joints of sham-operated WT and DP1<sup>-/-</sup> mice (n = 5 mice per genotype) and DMM-operated WT and DP1<sup>-/-</sup> mice (n = 5 mice per genotype) at 2 weeks postsurgery. Results showed that the expression levels of these proteins were elevated in the knee joints of both DP1<sup>-/-</sup> and WT mice (see Supplementary Figures 2A–C, available on the Arthritis & Rheumatology web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>). Interestingly, the number of cells staining for MMP-13 and ADAMTS-5 was higher in DP1<sup>-/-</sup> mouse cartilage relative to WT mouse cartilage. The expression of these proteins was barely detectable in sham-operated knees.

To determine whether the observed immunohistochemical changes in protein expression were paralleled by changes at the mRNA level, we performed real-time PCR analyses. Consistent with the changes at the protein level, we found that the levels of MMP-13 and ADAMTS-5 mRNA were more elevated in DP1<sup>-/-</sup> mice compared to their WT littermates at age 9 months (n = 3 replicate experiments, 5 joints per replicate) (Figure 3C). The levels of MMP-13 and ADAMTS-5 mRNA were also more elevated in DP1<sup>-/-</sup> mice compared to their WT littermates at 2 weeks post-DMM surgery (n = 3 replicate experiments, 8 joints per replicate) (see Supplementary Figure 2C, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>). Hence, deletion of the DP1 gene may exacerbate cartilage degradation by enhancing the expression of MMP-13 and ADAMTS-5.

### **Enhanced OA-like bony changes in DP1-deficient mice with spontaneous aging-associated OA**

Micro-CT analyses were performed to evaluate the microarchitectural changes that occurred in the subchondral bone of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at ages 3 months and 15 months (n = 6 mice per genotype per time point). Axial micro-CT scans of the medial tibiae of mice at age 3 months revealed no difference in the severity of subchondral bone sclerosis between WT and DP1<sup>-/-</sup> mouse joints. In contrast, scans of the medial tibiae of DP1<sup>-/-</sup> mice at age 15 months demonstrated dramatically more severe subchondral bone sclerosis as compared to that of age-matched WT mice (Figure 4A).

Morphometric parameters of the subchondral bone (i.e., the BV/TV, TbTh, and TbSp) in the central weight-bearing region of the medial plateau were also assessed. At age 3 months, there was no significant difference in any of these variables (BV/TV, TbTh, or TbSp) between WT and DP1<sup>-/-</sup> mice (Figure 4B). At age 15 months, the BV/TV and TbTh of DP1<sup>-/-</sup> mice were each significantly higher than those of WT mice. In contrast, the TbSp in DP1<sup>-/-</sup> mouse joints at age 15 months tended to decrease, although the difference was not statistically significant compared to WT mouse joints.

Furthermore, 3-D renderings of the tibiae showed that the knee joints from 15-month-old WT mice were largely intact, with clear joint space and no heterotopic ossification. In contrast, DP1<sup>-/-</sup> mice of the same age showed joint space narrowing, increased mineralization of the meniscus, sesamoid bone enlargement, and ectopic bone formation (Figure 4C).

We also evaluated subchondral bone microarchitectural changes in sham-operated WT and DP1<sup>-/-</sup> mice (n = 6 mice per genotype) and DMM-operated WT and DP1<sup>-/-</sup> mice (n = 8 mice per genotype) at 8 weeks postsurgery. As expected, subchondral bone sclerosis was found in the medial tibia of both WT and DP1<sup>-/-</sup> mice, although the sclerosis appeared to be more severe in DP1<sup>-/-</sup> mice (see results in Supplementary Figures 3A–C, available on the Arthritis & Rheumatology web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>).

The BV/TV and TbTh of the subchondral bone of the medial tibial plateau of DMM-operated mouse knees were each significantly higher compared to those of sham-operated control mouse knees at 8 weeks postsurgery, both in WT mice and in DP1<sup>-/-</sup> mice,

whereas the TbSp of the subchondral bone of DP1<sup>-/-</sup> mice was slightly lower, but not significantly different from, that of WT mice (see Supplementary Figure 3B, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>). It is noteworthy that the magnitude of these changes was more pronounced in DP1<sup>-/-</sup> mice.

The 3-D renderings of the tibiae of sham-operated and DMM-operated WT and DP1<sup>-/-</sup> mice showed meniscal calcification, sesamoid bone enlargement, and periarticular mineralization, which were more pronounced in DP1<sup>-/-</sup> mice (see Supplementary Figure 3C, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.40160/abstract>). The sham-operated control knees from both genotypes showed no changes in bone parameters or integrity.

### **Enhancement of IL-1 $\alpha$ -induced proteoglycan degradation with DP1 deletion**

To further understand the mechanisms of increased cartilage degradation in DP1<sup>-/-</sup> mice, we performed in vitro experiments using cartilage explants from WT and DP1<sup>-/-</sup> mice (n = 3 replicate experiments, 2 mice per sample). The cartilage was left untreated or treated with IL-1 $\alpha$  for 3 days, and proteoglycan degradation (i.e., the rate of GAG release) was determined. In the absence of any treatment, proteoglycan degradation in DP1<sup>-/-</sup> mouse cartilage was comparable to that in WT mouse cartilage (Figure 5). In the presence of IL-1 $\alpha$ , there was a marked increase in proteoglycan degradation in cartilage explants from both DP1<sup>-/-</sup> mice and WT mice compared to untreated controls. The rate of proteoglycan degradation was significantly higher in DP1<sup>-/-</sup> mouse explants (Figure 5). These results further confirm that DP1 deletion enhances the release of catabolic enzymes and cartilage degradation.

### **Attenuation of DMM-induced OA using the DP1 agonist BW245C**

We next examined the effect of BW245C, a selective agonist of DP1, on OA progression in WT mice subjected to sham surgery (n = 7 mice per group) or DMM surgery (n = 8 mice per group). Starting on 1 day postsurgery, mice were intraperitoneally injected daily with phosphate buffered saline (PBS) as a vehicle control or BW245C (0.5 mg/kg body weight per day; injection volume 0.2 ml) for 8 weeks. Treatment with BW245C, but not with the PBS vehicle control, decreased the severity of cartilage lesions (Figures 6A and B).

Moreover, OARSI scoring consistently confirmed that the BW245C injection significantly suppressed the histologic severity of OA in DMM-operated mouse joints (Figure 6B).

In addition to its attenuating effects on articular cartilage destruction, intraperitoneal administration of BW245C reduced OA-related bony changes (Figure 6C). There were no structural changes in sham-operated knees treated with the PBS vehicle control or BW245C. These results indicate that intraperitoneal administration of BW245C exerts a protective effect against the pathogenesis of OA, including a reduction in the severity of articular cartilage destruction and subchondral bone changes.

## **DISCUSSION**

In this study, we demonstrated that mice deficient in DP1 showed increased cartilage degradation with age or following DMM knee surgery. This effect of DP1 deletion was associated with enhanced expression of MMP-13 and ADAMTS-5 and with pronounced changes in the subchondral bone parameters. Moreover, we demonstrated that administration of a DP1 agonist exerted a protective effect against DMM-induced OA in WT mice.

Histologic examination revealed that cartilage structural damage was relatively more severe in DP1<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice in both models of OA. To determine the mechanism underlying the effect of DP1 deficiency on cartilage degradation, we analyzed the levels of ADAMTS-5 and MMP-13, key proteases of cartilage extracellular matrix degradation (5-7). Results showed that there was little or no expression of MMP-13 or ADAMTS-5 in the knee joints of DP1<sup>-/-</sup> and WT mice at 3 months of age. At 9 months of age, the expression levels of ADAMTS-5 and MMP-13 remained almost undetectable in WT mice, but both were significantly elevated in the knee joints of DP1<sup>-/-</sup> mice. In the DMM model, the expression levels of MMP-13 and ADAMTS-5 were more elevated in articular cartilage from DP1<sup>-/-</sup> mice than that from WT control mice.

Ex vivo studies with cartilage explants revealed that the rate of proteoglycan degradation following stimulation with IL-1 $\alpha$  was higher in cartilage from DP1<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice, suggesting that DP1 deletion enhanced the expression of cartilage-degrading enzymes. This is consistent with our previous findings showing that DP1 activation prevented the expression of MMP-13 and MMP-1 in cultured chondrocytes (34). Taken

together, these data strongly suggest that DP1 deletion mediates the up-regulation of MMPs and possibly other catabolic enzymes that exacerbate cartilage degradation.

In addition to cartilage destruction, OA both in humans and in experimental models is characterized by subchondral bone changes (3, 42). Micro-CT analysis revealed extensive subchondral bone sclerosis, increased BV/TV and TbTh, and decreased TbSp in DP1<sup>-/-</sup> mouse joints at age 15 months compared to WT mouse joints at the same age. We also noted that significant ectopic bone developed in the knee joints of DP1<sup>-/-</sup> mice at age 15 months. These parameters were also increased at 8 weeks following DMM surgery in both genotypes. Interestingly, in the DMM model, the magnitude of osseous changes was also more pronounced in DP1<sup>-/-</sup> mice. Thus, DP1 deficiency not only accelerates cartilage degradation, but also exacerbates subchondral bone changes.

Having demonstrated that DP1 deletion aggravates OA-like changes, we tested whether administration of the DP1 selective agonist BW245C could alter OA development in WT mice. We found that administration of a selective DP1 agonist reduced DMM-induced OA-like changes in both cartilage and bone. Interestingly, BW245C lost its beneficial effect in DP1<sup>-/-</sup> mice (data not shown), which excludes the possibility that cross-reactivity with distinct pathways may be responsible for the observed effect of BW245C.

Subchondral bone and cartilage behave as a functional unit both biochemically and mechanically (43), and alteration in cell function metabolism in one tissue may affect both tissues during the process of OA. Although our data clearly demonstrate a central role for DP1 in the pathogenesis of OA, it is unclear whether the exacerbation of OA in the absence of DP1 originates from alterations in bone or cartilage metabolism. Further analyses using cartilage- and bone-specific DP1-deficient mice would determine the tissue-specific role of DP1 during the progression of OA.

In addition to increased expression of MMP-13 and ADAMTS-5, DP1 deletion can exacerbate OA via magnification of inflammation. Indeed, several studies showed that DP1 deficiency amplifies, whereas DP1 activation dampens, inflammation in a number of models. For example, DP1 deficiency was shown to exacerbate skin inflammation in a model of contact hypersensitivity, and this was accompanied by increased production of interferon- $\gamma$  and IL-17 (25). Moreover, chimeric mice with selective hematopoietic DP1 deficiency had enhanced airway inflammation, and administration of a selective DP1

agonist substantially suppressed the elicitation of inflammatory allergic reactions in an IL-10-dependent manner (21). DP1 deficiency was also shown to aggravate lung inflammation in mice with bleomycin-induced acute lung injury, and this was associated with increased production of leukemia inhibitory factor, osteopontin, and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (16).

In another study, treatment of DP1-deficient mice with a DP1 agonist was shown to be protective by decreasing inflammatory responses and fibrosis (17). In addition, DP1 activation prevented skin lesions in a murine model of atopic dermatitis, likely acting through reduced recruitment of inflammatory cells into the dermis and increased production of the immunoregulatory cytokine IL-10 (22). Finally, BW245C was shown to prevent the progression of collagen-induced arthritis in mice by suppressing the secretion of the proinflammatory mediators IL-1, IL-6, and IL-17 and PGE2 (44). It is therefore possible that enhanced production of proinflammatory mediators could also contribute to the exacerbation of OA seen in DP1<sup>-/-</sup> mice.

An additional mechanism by which DP1 deletion can exacerbate OA is by enhancing angiogenesis, a hallmark of OA (45). Indeed, DP1 deficiency was shown to potentiate, and BW245C to inhibit, angiogenesis and vascular hyperpermeability (46). Thus, the aggravated OA seen in DP1<sup>-/-</sup> mice can be attributed, at least partially, to enhanced angiogenesis.

The precise mechanisms by which deletion of DP1 exacerbates OA are likely multiple, but could involve down-regulation and impairment of the cAMP/protein kinase A (PKA) pathway. Indeed, DP1 signals through the cAMP/PKA pathway (47) and we have previously shown that DP1 activation inhibits the expression of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes via the cAMP/PKA pathway (34). Moreover, several studies found that activation of the cAMP/PKA pathway in chondrocytes prevented the expression of various inflammatory and catabolic mediators such as nitric oxide, vascular endothelial growth factor, and MMPs 48-52. Therefore, it is possible that down-regulation of the cAMP/PKA pathway mediates, at least partially, the exacerbating effect of DP1 deletion on the progression of OA.

DP1 deletion could be compensated for by DP2, the other PGD2 receptor. This is unlikely, since both receptors usually transmit signals that are antagonistic (25-27). On the other

hand, we previously reported that DP2 agonists had no effect on the production of MMP-1 and MMP-13 in cultured chondrocytes (34). Moreover, and in contrast to the findings in WT mice, treatment of DP1<sup>-/-</sup> mice with BW245C had no effect on the progression of DMM-induced OA (data not shown).

**In conclusion**, this study provides valuable insight into the role of DP1 in the pathophysiology of OA and suggests that targeting DP1 could be a potential therapeutic strategy for the prevention and treatment of OA.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Virginia Wallis for her assistance with preparation of the manuscript. We also thank members (the managers, veterinarians, and animal caretakers) at the University of Montreal Hospital Research Centre animal facility for their assistance and for maintaining the mice for this study.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Fahmi had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

### **Study conception and design**

Ouhaddi, Fahmi.

### **Acquisition of data**

Ouhaddi, Nebbaki, Habouri, Afif, Narumiya, Fahmi.

### **Analysis and interpretation of data**

Ouhaddi, Nebbaki, Habouri, Afif, Lussier, Kapoor, Narumiya, Pelletier, Martel-Pelletier, Benderdour, Fahmi.



## References:

1. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2014;28:5–15.
2. Brooks PM. The burden of musculoskeletal disease: a global perspective. *Clin Rheumatol* 2006;25:778–81.
3. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012;64:1697–707.
4. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, et al. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 2009;60:3723–33.
5. Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001;107:35–44.
6. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005;434:644–8.
7. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005;434:648–52.
8. Hirata M, Kakizuka A, Aizawa M, Ushikubi F, Narumiya S. Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11192–6.
9. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, et al. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 2001;193:255–61.
10. Morrow JD, Parsons WG III, Roberts LJ II. Release of markedly increased quantities of prostaglandin D2 in vivo in humans following the administration of nicotinic acid. *Prostaglandins* 1989;38:263–74.

11. Whittle BJ, Moncada S, Mullane K, Vane JR. Platelet and cardiovascular activity of the hydantoin BW245C, a potent prostaglandin analogue. *Prostaglandins* 1983;25:205–23.
12. Narumiya S, Toda N. Different responsiveness of prostaglandin D<sub>2</sub>-sensitive systems to prostaglandin D<sub>2</sub> and its analogues. *Br J Pharmacol* 1985;85:367–75.
13. Urade Y, Hayaishi O. Prostaglandin D<sub>2</sub> and sleep/wake regulation. *Sleep Med Rev* 2011;15:411–8.
14. Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, et al. Prostaglandin D<sub>2</sub> as a mediator of allergic asthma. *Science* 2000;287:2013–7.
15. Ahmed SR, McGettrick HM, Yates CM, Buckley CD, Ratcliffe MJ, Nash GB, et al. Prostaglandin D<sub>2</sub> regulates CD4<sup>+</sup> memory T cell trafficking across blood vascular endothelium and primes these cells for clearance across lymphatic endothelium. *J Immunol* 2011;187:1432–9.
16. Van den Brule S, Huaux F, Uwambayinema F, Ibouaaden S, Yakoub Y, Palmair-Pallag M, et al. Lung inflammation and thymic atrophy after bleomycin are controlled by the prostaglandin D<sub>2</sub> receptor DP1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:212–22.
17. Van den Brule S, Wallemme L, Uwambayinema F, Huaux F, Lison D. The D prostanoid receptor agonist BW245C. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335:472–9.
18. Angeli V, Faveeuw C, Roye O, Fontaine J, Teissier E, Capron A, et al. Role of the parasite-derived prostaglandin D<sub>2</sub> in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *J Exp Med* 2001;193:1135–47.
19. Faveeuw C, Gosset P, Bureau F, Angeli V, Hirai H, Maruyama T, et al. Prostaglandin D<sub>2</sub> inhibits the production of interleukin-12 in murine dendritic cells through multiple signaling pathways. *Eur J Immunol* 2003;33:889–98.
20. Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Hoogsteden HC, Trottein F, Lambrecht BN. Prostaglandin D<sub>2</sub> inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol* 2003;171:3936–40.
21. Hammad H, Kool M, Soullie T, Narumiya S, Trottein F, Hoogsteden HC, et al. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung

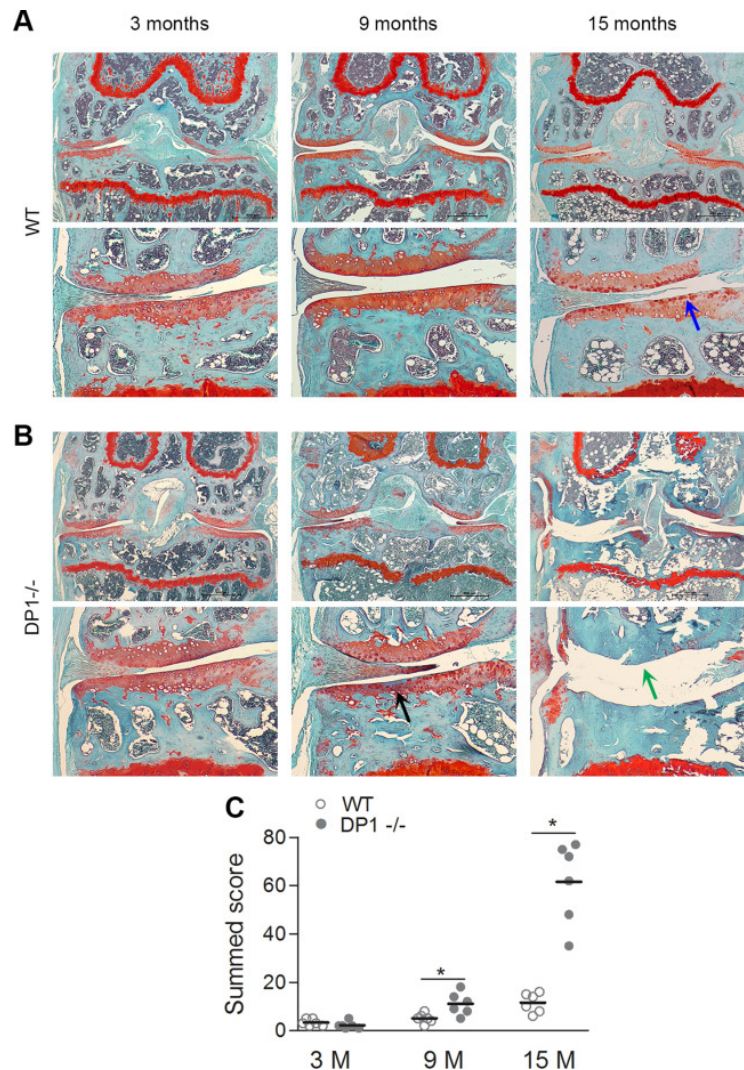
- dendritic cell function and induction of regulatory T cells. *J Exp Med* 2007;204:357–67.
22. Angeli V, Staumont D, Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P, Pichavant M, et al. Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol* 2004;172:3822–9.
  23. Gosset P, Bureau F, Angeli V, Pichavant M, Faveeuw C, Tonnel AB, et al. Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. *J Immunol* 2003;170:4943–52.
  24. Gosset P, Pichavant M, Faveeuw C, Bureau F, Tonnel AB, Trottein F. Prostaglandin D2 affects the differentiation and functions of human dendritic cells: impact on the T cell response. *Eur J Immunol* 2005;35:1491–500.
  25. Yamamoto Y, Otani S, Hirai H, Nagata K, Aritake K, Urade Y, et al. Dual functions of prostaglandin D2 in murine contact hypersensitivity via DP and CRTH2. *Am J Pathol* 2011;179:302–14.
  26. Sturm EM, Radnai B, Jandl K, Stancic A, Parzmair GP, Hogenauer C, et al. Opposing roles of prostaglandin D2 receptors in ulcerative colitis. *J Immunol* 2014;193:827–39.
  27. Sarashina H, Tsubosaka Y, Omori K, Aritake K, Nakagawa T, Hori M, et al. Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D2 during the progression of skin inflammation. *J Immunol* 2014;192:459–65.
  28. Gervais FG, Cruz RP, Chateaufneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, et al. Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:982–8.
  29. Monneret G, Gravel S, Diamond M, Rokach J, Powell WS. Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood* 2001;98:1942–8.
  30. Monneret G, Cossette C, Gravel S, Rokach J, Powell WS. 15R-methyl-prostaglandin D2 is a potent and selective CRTH2/DP2 receptor agonist in human eosinophils. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:349–55.
  31. Xue L, Gyles SL, Wetley FR, Gazi L, Townsend E, Hunter MG, et al. Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through

- an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *J Immunol* 2005;175:6531–6.
32. Spik I, Brenuchon C, Angeli V, Staumont D, Fleury S, Capron M, et al. Activation of the prostaglandin D2 receptor DP2/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse. *J Immunol*2005;174:3703–8.
  33. Satoh T, Moroi R, Aritake K, Urade Y, Kanai Y, Sumi K, et al. Prostaglandin D2 plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. *J Immunol*2006;177:2621–9.
  34. Zayed N, Afif H, Chabane N, Mfuna-Endam L, Benderdour M, Martel-Pelletier J, et al. Inhibition of interleukin-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinases 1 and 13 production in human osteoarthritic chondrocytes by prostaglandin D2. *Arthritis Rheum* 2008;58:3530–40.
  35. Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:1061–9.
  36. Ma HL, Blanchet TJ, Peluso D, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:695–700.
  37. Glasson SS, Chambers MG, van den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18 Suppl 3:S17–23.
  38. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, Blati M, Fahmi H, Lussier B, et al. PPAR $\gamma$  deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2015;74:569–78.
  39. Nebbaki SS, El Mansouri FE, Afif H, Kapoor M, Benderdour M, Pelletier JP, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and H- and L-prostaglandin D synthase during osteoarthritis in the spontaneous Hartley guinea pig and experimental dog models. *J Rheumatol*2013;40:877–90.
  40. Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* 2008;3:1253–60.

41. Chabane N, Zayed N, Afif H, Mfunu-Endam L, Benderdour M, Boileau C, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress interleukin-1 $\beta$ -induced nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> production in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:1267–74.
42. Barr AJ, Campbell TM, Hopkinson D, Kingsbury SR, Bowes MA, Conaghan PG. A systematic review of the relationship between subchondral bone features, pain and structural pathology in peripheral joint osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:228.
43. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22:1077–89.
44. Maicas N, Ibanez L, Alcaraz MJ, Ubeda A, Ferrandiz ML. Prostaglandin D<sub>2</sub> regulates joint inflammation and destruction in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:130–40.
45. Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:390–8.
46. Murata T, Lin MI, Aritake K, Matsumoto S, Narumiya S, Ozaki H, et al. Role of prostaglandin D<sub>2</sub> receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20009–14.
47. Crider JY, Griffin BW, Sharif NA. Prostaglandin DP receptors positively coupled to adenylyl cyclase in embryonic bovine tracheal (EBTr) cells: pharmacological characterization using agonists and antagonists. *Br J Pharmacol* 1999;127:204–10.
48. Tesch AM, MacDonald MH, Kollias-Baker C, Benton HP. Chondrocytes respond to adenosine via A<sub>2</sub> receptors and activity is potentiated by an adenosine deaminase inhibitor and a phosphodiesterase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:34–43.
49. Attur M, Al-Mussawir HE, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP<sub>4</sub> receptor. *J Immunol* 2008;181:5082–8.
50. Karsdal MA, Sumer EU, Wulf H, Madsen SH, Christiansen C, Fosang AJ, et al. Induction of increased cAMP levels in articular chondrocytes blocks matrix metalloproteinase-mediated cartilage degradation, but not aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 2007;56:1549–58.

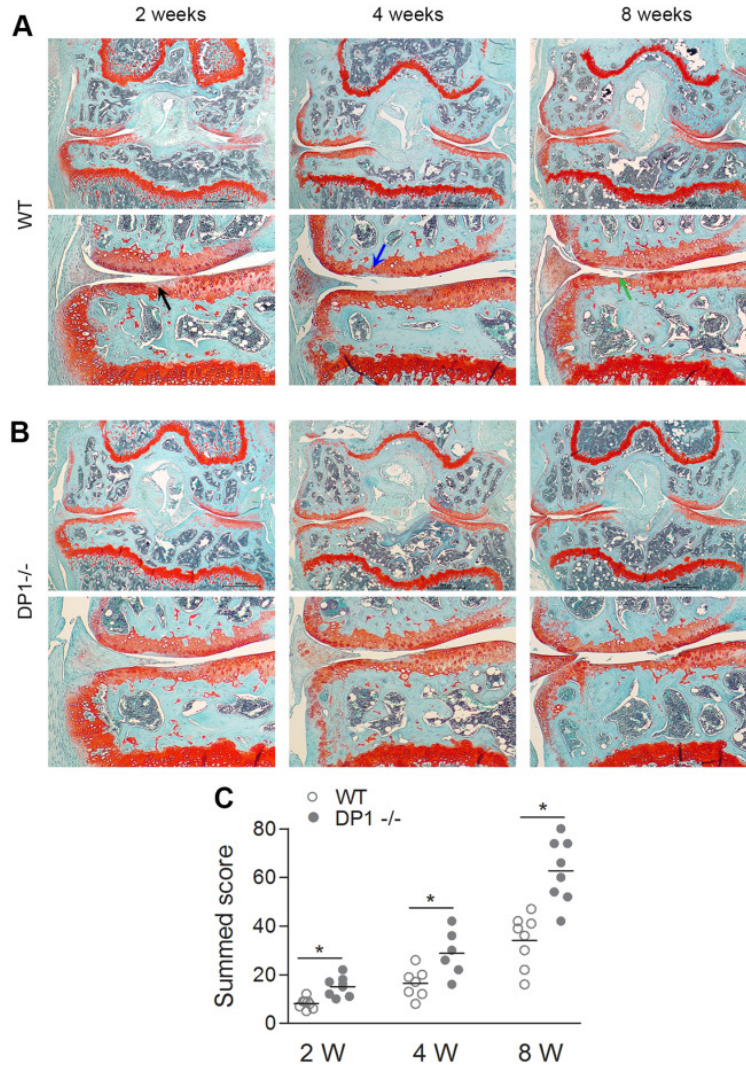
51. Sato T, Konomi K, Fujii R, Aono H, Aratani S, Yagishita N, et al. Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2011;70:221–6.
52. Li TF, Zuscik MJ, Ionescu AM, Zhang X, Rosier RN, Schwarz EM, et al. PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Exp Cell Res* 2004;300:159–69.

**Figures and legends:**



**Figure 1: Accelerated cartilage erosion in D prostanoid receptor 1-deficient (DP1<sup>-/-</sup>) mice with age.** A and B, Coronal sections of the whole knee joints from wild-type (WT) mice (A) and DP1<sup>-/-</sup> mice (B) at ages 3 months, 9 months, and 15 months were prepared and stained with Safranin O-fast green to assess the integrity of the articular cartilage. Each image shown is a representative section selected from 48 sections from an experimental group (8 sections from each knee joint; 6 knee joints in each experimental group). The representative section was selected based on the average histologic severity score in each group. Black arrow indicates reduced Safranin O staining. Blue arrow indicates areas of fibrillation and clefts in the cartilage. Green arrow indicates eburnation of subchondral bone. Original magnification  $\times 40$  in upper panels;  $\times 200$  in lower panels. C, Summed histologic scores for osteoarthritis (OA) severity in the knee cartilage from WT

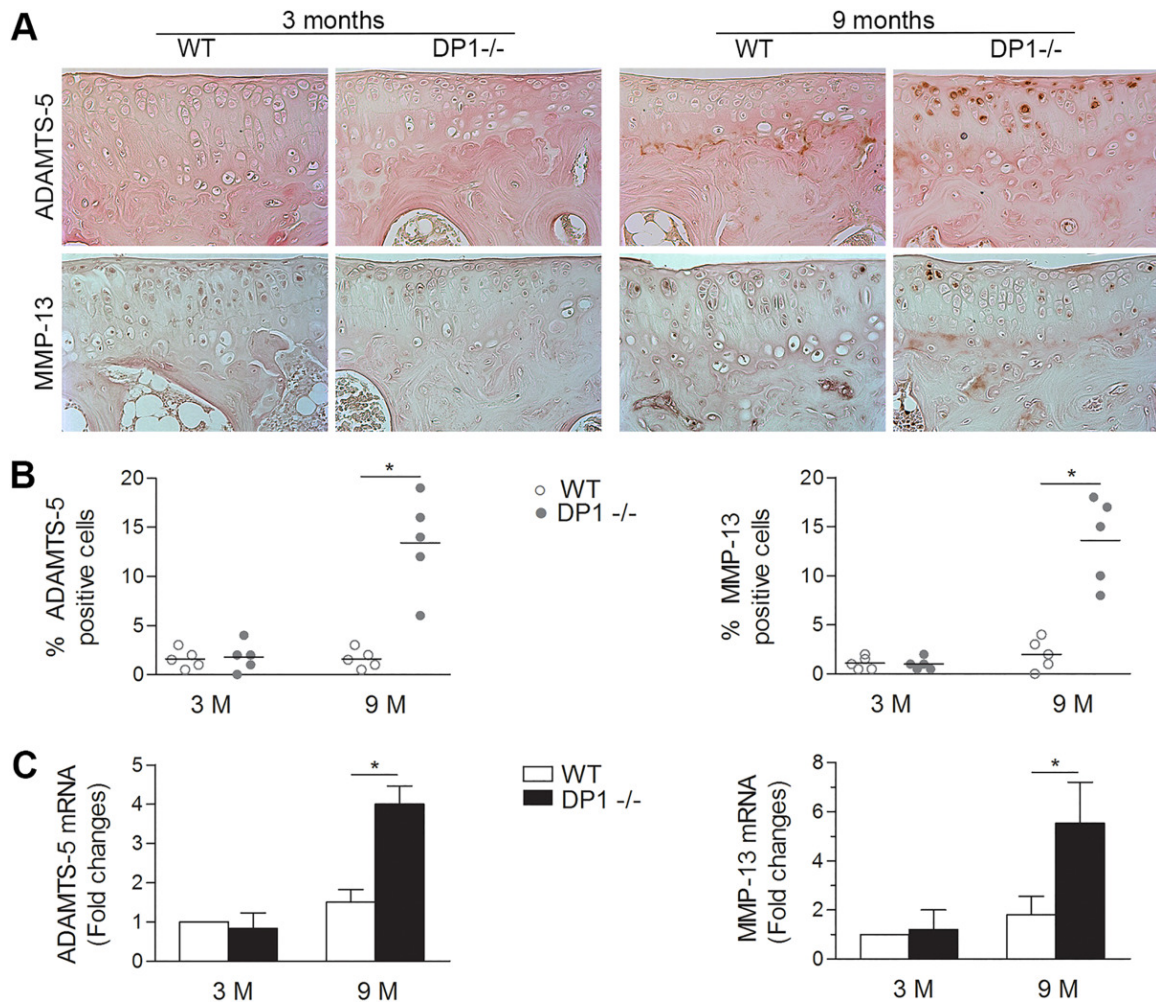
and DP1<sup>-/-</sup> mice at ages 3, 9, and 15 months, as determined using the OA Research Society International scoring system, are shown. Symbols represent individual mice; horizontal lines indicate the mean. \* = P < 0.05.



**Figure 2: Accelerated progression of OA in DP1<sup>-/-</sup> mice following destabilization of the medial meniscus (DMM) surgery.** A and B, Ten-week-old WT mice (A) and DP1<sup>-/-</sup> mice (B) were subjected to sham operation or DMM surgery. Knee joint samples were harvested at 2 weeks (n = 8 WT and 8 DP1<sup>-/-</sup> mice), 4 weeks (n = 7 WT and 6 DP1<sup>-/-</sup> mice), and 8 weeks (n = 8 WT and 8 DP1<sup>-/-</sup> mice) postsurgery, and then prepared and stained with Safranin O-fast green to assess the extent of articular cartilage degeneration. Each image shown is a representative section selected from 48–64 sections from an experimental group (8 sections from each knee joint; 6–8 knee joints in each experimental group). The representative section was selected based on the average histologic severity score in each experimental group. Black

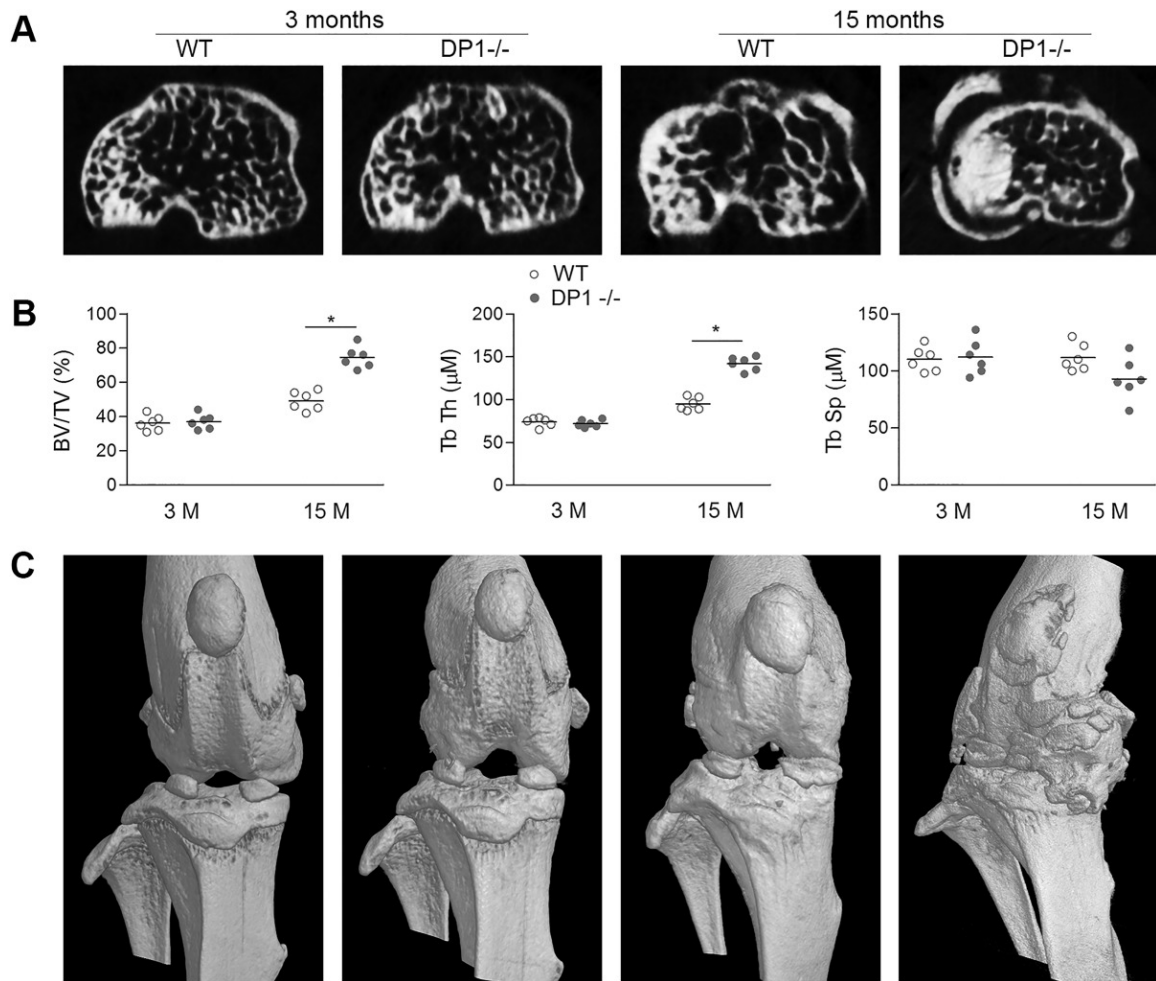


arrow indicates reduced Safranin O staining. Blue arrow indicates areas of fibrillation and clefts in the cartilage. Green arrow shows loss of cartilage. C, Summed histologic scores for OA severity in the knee cartilage from WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at 2, 4, and 8 weeks after DMM surgery, as determined using the OA Research Society International scoring system, are shown. Symbols represent individual mice; horizontal lines indicate the mean. \* = P < 0.05. See Figure 1 for other definitions.



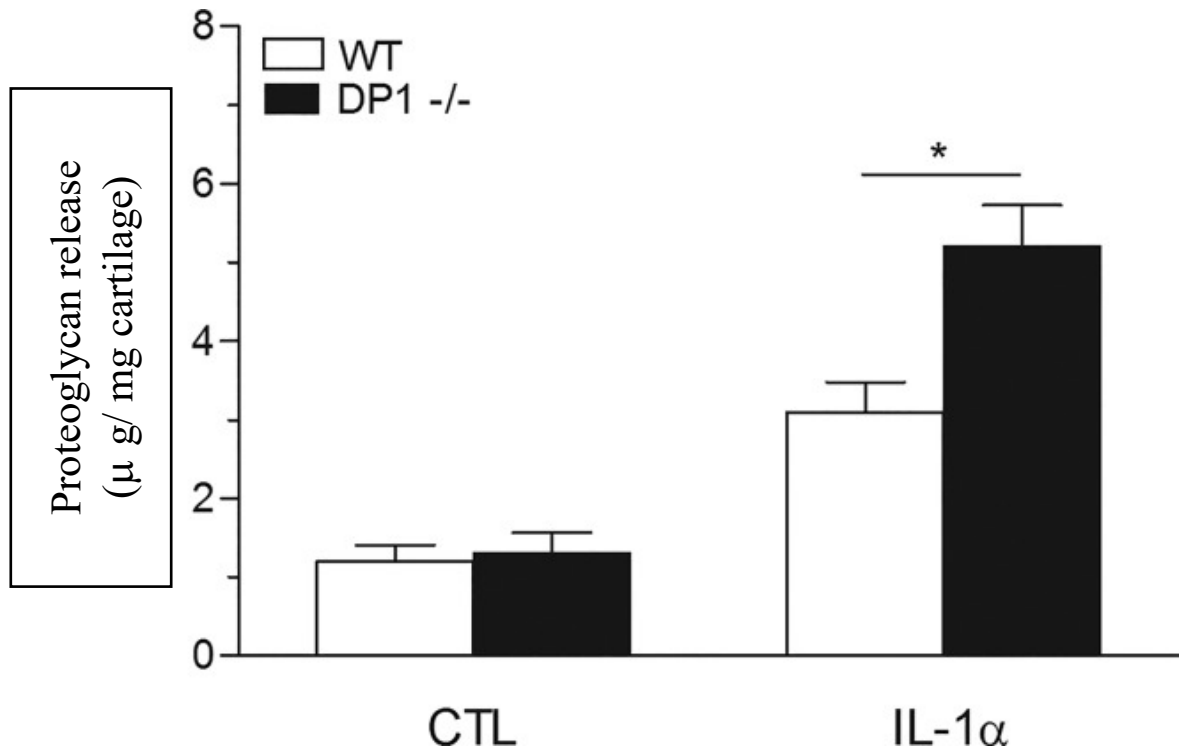
**Figure 3: Expression of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) and ADAMTS-5 in the knee joints of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at ages 3 months and 9 months.** A, Knee joint sections from 3-month-old and 9-month-old mice (n = 5 mice per genotype per age group) were analyzed by immunohistochemical staining for the expression of ADAMTS-5 and MMP-13. Each image shown is a representative section selected from 25 sections from an experimental group (5 sections from

each knee joint; 5 knee joints in each experimental group). B, The percentage of chondrocytes expressing ADAMTS-5 and MMP-13 is shown for each genotype. Symbols represent individual mice; horizontal lines indicate the mean. C, Expression of ADAMTS-5 mRNA and MMP-13 mRNA was assessed in joint tissue from WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at ages 3 months and 9 months. Results are the mean  $\pm$  SD fold change relative to the values for 3-month-old WT control mice (set as 1), from 3 pooled RNA samples (each sample extracted from the articular cartilage of 5 joints). \* =  $P < 0.05$ . See Figure 1 for other definitions.

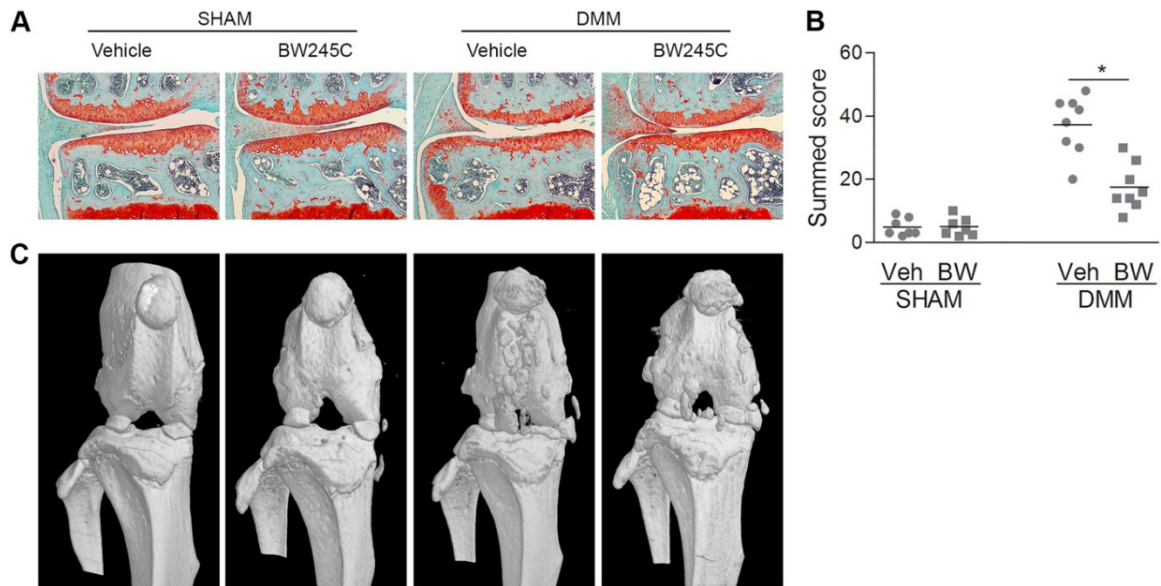


**Figure 4: Micro-computed tomography (micro-CT) analysis of the subchondral bone of the tibial plateau of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at ages 3 months and 15 months.** A, Knee joints from 3-month-old and 15-month-old WT and DP1<sup>-/-</sup> mice were evaluated by micro-CT. Representative axial micro-CT images of the subchondral bone compartment are shown (n = 6 mice per genotype

per time point). B, Trabecular bone volume fraction (bone volume/total volume [BV/TV]), trabecular thickness (TbTh), and trabecular separation distance (trabecular space [TbSp]) were assessed in the subchondral region of the medial tibial plateau of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at ages 3 months and 15 months. Symbols represent individual mice; horizontal lines indicate the mean. \* = P < 0.05. C, Representative 3-dimensional reconstructions of the knee joints from WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at ages 3 months and 15 months (n = 6 mice per group) are shown. See Figure 1 for other definitions.



**Figure 5: Deletion of DP1 enhances interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )–induced proteoglycan degradation in conditioned medium from cultured knee cartilage explants.** Femoral heads from WT and DP1<sup>-/-</sup> mice were stimulated with 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  for 72 hours (or left untreated as a control [CTL]). Proteoglycan degradation in the conditioned medium from cultured explants was evaluated using a dimethylmethylene blue assay. Results are the mean  $\pm$  SD levels of sulfated glycosaminoglycan released per mg cartilage from 3 separate samples (n = 3 samples per group; 2 mice per sample). \* = P < 0.05. See Figure 1 for other definitions.



**Figure 6: Treatment with the DP1 agonist BW245C (BW) reduces the severity of OA in the destabilization of the medial meniscus (DMM) model.** Ten-week-old WT mice were subjected to sham surgery (n = 7 mice per group) or DMM surgery (n = 8 mice per group). BW245C was administered intraperitoneally every day (0.5 mg/kg/day) beginning 1 day after surgery for 8 weeks. Phosphate buffered saline was used as a vehicle (Veh) control. The knee joints were collected and cartilage degradation was analyzed using Safranin O–fast green staining. A, Representative immunostained images are shown. The representative section was selected based on the average histologic severity score in each experimental group. B, Summed histologic OA severity scores were determined using the OA Research Society International scoring system. Symbols represent individual mice; horizontal lines indicate the mean. \* = P < 0.05. C, Representative 3-dimensional reconstructions of the knee joint (obtained from micro-computed tomography images) are shown for sham-operated and DMM-operated mice (n = 7–8 mice per group) at 8 weeks after surgery and following treatment with vehicle control or BW245C. See Figure 1 for other definitions.

## **SUPPLEMENTARY METHODS**

### **Immunohistochemistry**

Knee joints were fixed in TissuFix, decalcified in 10% EDTA for 14 days at 4°C, and embedded in paraffin. Immunohistochemical analysis was performed as previously described (1, 2). Briefly, sections were pre-incubated with chondroitinase ABC (0.25 U/ml in PBS pH 8.0) for 60 min at 37°C, followed by a 30 min incubation with Triton X-100 (0.3%) at room temperature. Slides were then washed in PBS followed by 2% hydrogen peroxide/methanol for 15 min. They were further incubated for 60 min with 2% normal serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and overlaid with primary antibody for 18 hours at 4°C in a humidified chamber. The following antibodies were used: rabbit polyclonal anti-ADAMTS-5 (1:100 dilution; Cedarlane, Hornby, ON, Canada), and rabbit polyclonal anti-MMP-13 (1:100 dilution; Sigma-Aldrich). Each slide was washed 3 times in phosphate-buffered saline (pH 7.4) and incubated with a secondary antibody using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) following the manufacturer's instructions. The colour was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Vector Laboratories) containing hydrogen peroxide. The slides were counterstained with eosin. Each slide was examined and scored by 2 independent observers (YO and HA) who were blinded to group allocation. The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive were evaluated and results were expressed as the percentage of chondrocytes staining positive (cell score).

### **BW245C administration**

BW245C was administered in PBS via daily intraperitoneal injection (0.5 mg/kg) for 8 weeks alternating daily between left and right sides of the abdomen. The mice were closely monitored during the study. The BW245C solution was freshly prepared every day before each injection.

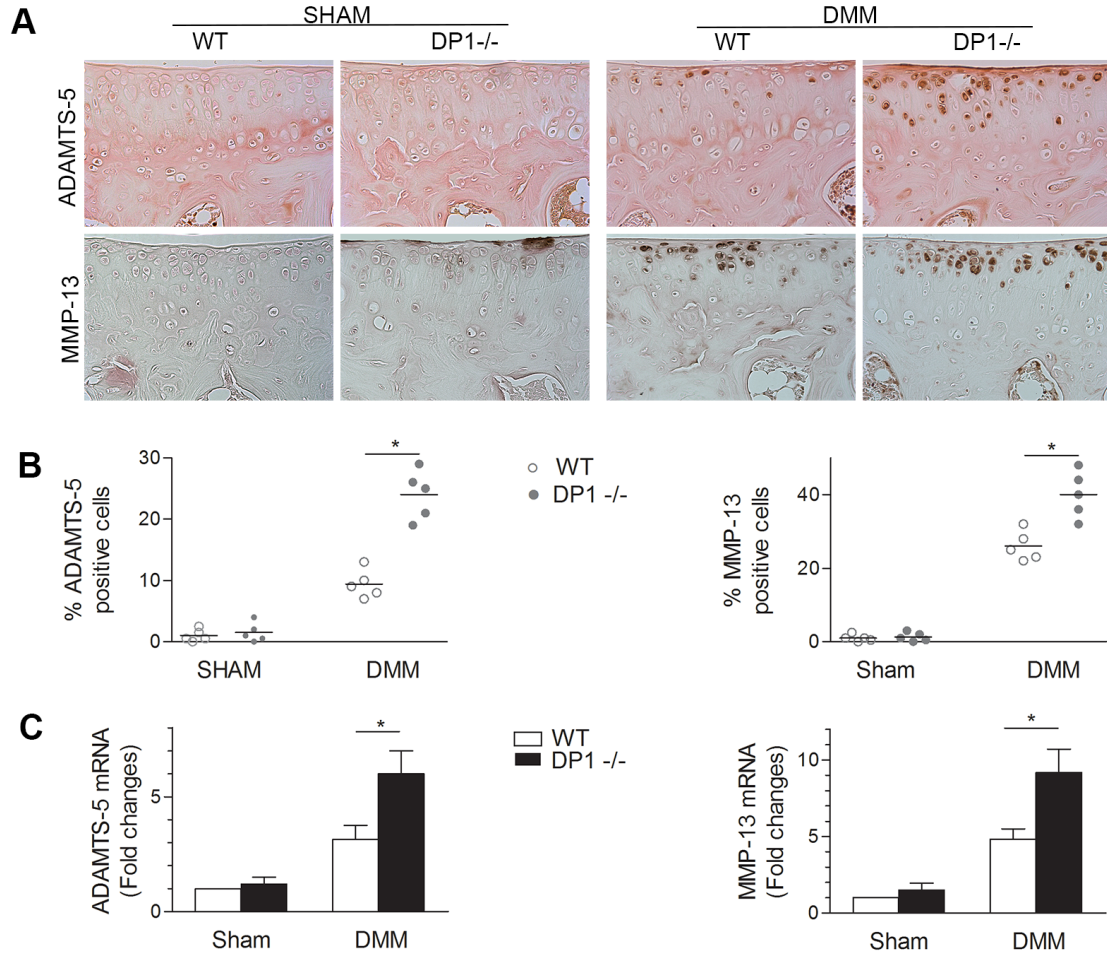
### **Isolation of primary chondrocytes and measurement of cAMP levels**

Primary epiphyseal chondrocytes were isolated from 5- to 6-day-old mice as previously reported (3). Briefly, cartilage tissues, including the femoral heads, femoral condyles and tibial plateaus, were digested twice for 45 min each with 3 mg/ml collagenase D. Then, the cartilage pieces were incubated with 0.5 mg/ml collagenase D at 37°C in a thermal incubator with 5% CO<sub>2</sub> overnight. The cell suspension was filtered through a 70- $\mu$ m cell strainer and the released cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At confluence, the cells were detached and plated in 6-well plates (6 x 10<sup>5</sup>/well) for RNA analysis or in 24-well plates (2 x 10<sup>5</sup>/well) for measurement of cAMP levels. Only first-passage cells were used for the experiments. For the measurement of cAMP generation, chondrocytes were preincubated with 10  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methylxanthine for 30 min and then stimulated with PGD<sub>2</sub> (1  $\mu$ M), BW245C (1  $\mu$ M) or PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) for 15 min. The intracellular levels of cAMP were measured using a cAMP enzyme immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). All measurements were performed in duplicate.

1. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, Blati M, Fahmi H, Lussier B, et al. PPARgamma deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2015;74:569-78.
2. Nebbaki SS, El Mansouri FE, Afif H, Kapoor M, Benderdour M, Pelletier JP, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha, beta, gamma, and H- and L-prostaglandin D synthase during osteoarthritis in the spontaneous hartley guinea pig and experimental dog models. *J Rheumatol* 2013;40:877-90.
3. Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* 2008;3:1253-60.

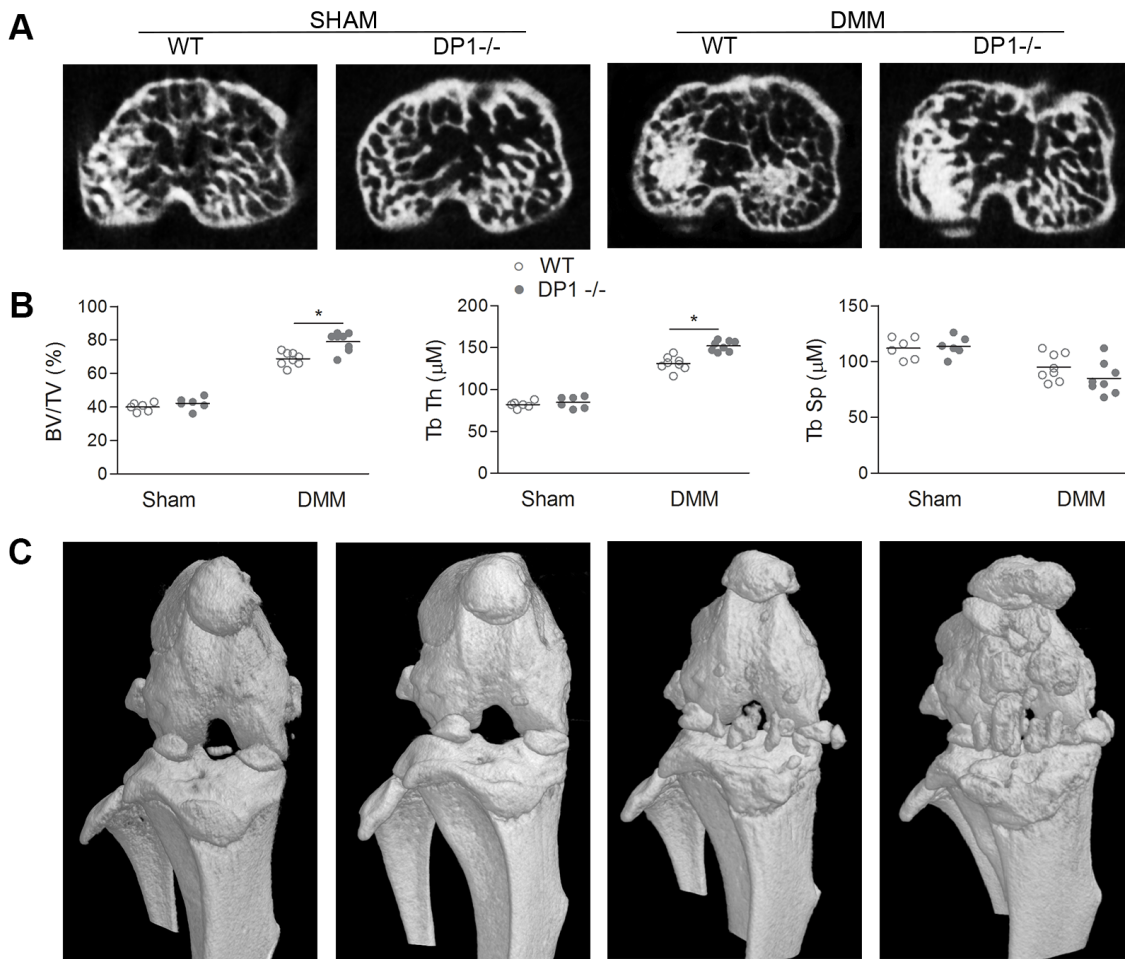


**Supplemental Figures:**



**Supplemental Figure 1. Expression of MMP-13 and ADAMTS-5 in the knee joints of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at 2 weeks post-surgery.** Knee joint sections from sham- and DMM-operated mice at 2 weeks post-surgery were analyzed by immunohistochemistry for MMP-13 and ADAMTS-5 (A) as described in the Materials and Methods section. (B) Percentage of chondrocytes expressing MMP-13 and ADAMTS-5. The results are the mean  $\pm$  SEM of the evaluation of 5 sections taken from each knee with 5 knee joints per group. \*P<0.05 versus WT mice. (C) Expression of MMP-13 and ADAMTS-5 mRNA at 2 weeks post-sham or -DMM surgery. Results are expressed as -fold change, considering 1 as the value of control (i.e. sham-operated WT mice) and are the mean  $\pm$  SEM from 3 pooled RNA samples, each extracted from the articular cartilage of eight operated knees. \*P<0.05 versus WT mice.





**Supplemental Figure 2. Micro-CT analysis of the subchondral bone of the tibial plateau of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at 8 weeks post-DMM surgery.** Knee joints from sham- and DMM-operated wild-type (WT) and DP1<sup>-/-</sup> mice were evaluated by micro-CT at 8 weeks post-surgery. **A)** Representative axial micro-CT images of the subchondral bone compartment of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at 8 weeks after sham or DMM surgery (n = 6 to 8 mice in each group). **B)** Quantification of BV/TV, Tb.Th, and Tb.Sp in the subchondral region of the medial tibial plateau of WT and DP1<sup>-/-</sup> mice at 8 weeks post-surgery in sham- and DMM-operated WT and DP1<sup>-/-</sup> mice (n = 6 to 8 mice per group). **E)** Representative 3D reconstructions of the knee joints of sham- and DMM-operated WT and DP1<sup>-/-</sup> mice (n = 6 to 8 mice per group) at 8 weeks post-surgery.

## Article 2

**Objectif:** La prostaglandine D synthase de type lipocaline (L-PGDS) catalyse la formation de prostaglandine D2 (PGD2) qui joue un rôle important dans l'inflammation et le métabolisme du cartilage. Cependant, on sait peu de choses sur son rôle dans l'arthrose. Le but de cette étude était d'étudier les effets du déficit en L-PGDS à l'aide d'un modèle murin d'arthrose expérimentale.

**Méthodes:** Une arthrose expérimentale a été induite chez des souris de type sauvage (WT) et Knock-out en L-PGDS (L-PGDS  $-/-$ ) par déstabilisation du ménisque médial (DMM). La dégradation du cartilage a été évaluée par histologie. L'expression des marqueurs d'arthrose a été évaluée par immunohistochimie. Les modifications osseuses ont été déterminées par microtomographie aux rayons X ( $\mu$ CT). Des explants de cartilage de souris L-PGDS  $-/-$  et WT ont été traités avec de l'interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) ex vivo, afin d'évaluer la dégradation des protéoglycanes. De plus, l'effet de l'injection intra-articulaire d'un virus adéno-associé (AAV) codant pour L-PGDS 2/5 sur la progression de l'arthrose a été évalué chez des souris L-PGDS  $-/-$ .

**Résultats:** Comparativement aux souris WT, les souris L-PGDS  $-/-$  avaient exacerbé la dégradation du cartilage et amélioré l'expression de MMP-13 et d'ADAMTS-5. En outre, les souris L-PGDS  $-/-$  ont présenté une synovite accrue et des modifications osseuses sous-chondral. Les explants de cartilage de souris L-PGDS  $-/-$  ont montré une dégradation accrue des protéoglycanes après traitement avec IL-1 $\alpha$ . L'injection intra-articulaire d'AAV2 / 5 codant pour L-PGDS a atténué la dégradation du cartilage induite par le DMM et l'expression de ADAMTS-5 et MMP-13 chez des souris L-PGDS  $-/-$ .

**Conclusion:** Ensemble, ces résultats suggèrent un rôle important de la L-PGDS dans la pathogenèse de l'arthrose. Le ciblage de la L-PGDS pourrait constituer une nouvelle modalité thérapeutique efficace pour l'arthrose.

### **Contribution des auteurs :**

Yassine Ouhaddi : Planification et réalisation des expériences (figure 1 A-B, 2, 4, 5 C-D, 6 B-C, supplémentaire 2), analyse des données, correction de l'article.

Mehdi Najar : Planification et Réalisation des expériences (figure1 C-D, 3, 6 A, Figure supplémentaire 1), analyse des données, rédaction de l'article.

Frédéric Paré: Réalisation des expériences (Figure 5 A-B).

Bertrand Lussier : Réalisation des expériences (chirurgie des souris) et analyse des données.

Yoshihiro Urade : Analyse des données.

Mohit Kapoor : Analyse des données, correction de l'article.

Jean-Pierre Pelletier, Johanne Martel-Pelletier : Analyse des données et correction de l'article.

Mohamed Benderdour : Co-direction et analyse des données.

Hassan Fahmi : Planification, analyses des données, direction générale et rédaction de l'article.

## **Paper 2:**

### **Role of Lipocalin-type prostaglandin D synthase in experimental osteoarthritis**

Mehdi Najar, PhD<sup>1</sup>, Yassine Ouahdi, MSc<sup>1</sup>, Frédéric Paré<sup>1</sup>, Bertrand Lussier, DMV, MSc, Dipl ACVS<sup>2</sup>, Yoshihiro Urade, PhD<sup>3</sup>, Mohit Kapoor, PhD<sup>4</sup>, Jean-Pierre Pelletier, MD<sup>1</sup>, Johanne Martel-Pelletier, PhD<sup>1</sup>, Mohamed Benderdour, PhD<sup>5</sup> and Hassan Fahmi, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Clinical Science, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup>International Institute for Integrative Sleep Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, 305-8575 Ibaraki, Japan

<sup>4</sup>The Toronto Western Research Institute, University Health Network (UHN), Toronto, ON, Canada

<sup>5</sup>Research Centre, Sacré-Coeur Hospital, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

#### **Correspondence to:**

Hassan Fahmi,  
Osteoarthritis Research Unit,  
University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM),  
900 Saint-Denis, R11.424, Montreal, QC, Canada H2X 0A9  
Tel: + 1 514 890 8000 ext. 25119  
Fax: + 1 514 412 7583  
E-mail: h.fahmi@umontreal.ca

#### **Running head**

L-PGDS in experimental OA

#### **Funding**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP-130293.

#### **Competing interests**

**The authors declare no competing interests.**

## ABSTRACT

**Objective:** Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) catalyzes the formation of prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), which has important roles in inflammation and cartilage metabolism. We and others have shown that L-PGDS is expressed in cartilage, but its role in osteoarthritis (OA) is yet to be defined. The aim of this study was to investigate the role of L-PGDS in the pathogenesis of OA using an experimental mouse model.

**Methods:** Experimental OA was induced in wild-type (WT), and L-PGDS- deficient (L-PGDS<sup>-/-</sup>) mice by destabilization of the medial meniscus (DMM). Cartilage degradation was evaluated by histology. The expression of MMP-13 and ADAMTS-5 was assessed by immunohistochemistry. Bone changes were determined by microcomputed tomography (μ-CT). Cartilage explants from L-PGDS<sup>-/-</sup> and WT mice were treated with interleukin-1α (IL-1α) *ex vivo*, to evaluate proteoglycan degradation. Furthermore, the effect of intra-articular injection of an adeno-associated virus (AAV) 2/5 encoding L-PGDS on OA progression was evaluated in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice.

**Results:** Compared to WT mice, L-PGDS<sup>-/-</sup> mice had exacerbated cartilage degradation, and enhanced expression of MMP-13 and ADAMTS-5. Furthermore, L-PGDS<sup>-/-</sup> mice displayed increased synovitis and subchondral bone changes. Cartilage explants from L-PGDS<sup>-/-</sup> mice showed enhanced proteoglycan degradation following treatment with IL-1α. Intra-articular injection of AAV2/5 encoding L-PGDS reversed the exacerbation of DMM-induced cartilage damage in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice. The level of L-PGDS was increased in OA tissues of WT mice.

**Conclusion:** Collectively, these findings suggest a protective role of L-PGDS in OA, and therefore enhancing its level may constitute a promising therapeutic strategy.

## INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis, and a leading cause of disability. OA is primarily characterized by articular cartilage destruction, synovial inflammation, and subchondral bone remodeling [1, 2]. There is currently, no proven treatment to stop or slow the progression of OA, as the exact mechanisms underlying the initiation, and progression of the disease are yet largely unknown. A deeper understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of OA will be useful in the development of more effective therapeutic agents to prevent or treat OA.

Cartilage breakdown during OA is predominantly mediated by proteases, most notably, matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS-5). Indeed, MMP-13 overexpressing transgenic mice develop spontaneous OA-like cartilage damage [3], and MMP-13 deletion protected mice against OA-like cartilage damage [4]. In addition, ADAMTS-5 deficiency was shown to prevent cartilage destruction in mouse arthritis models [5, 6].

Increasing evidence indicates that prostaglandin D2 (PGD2) may have protective effects in OA. We have demonstrated that treatment of chondrocytes with PGD2 inhibits the induction of MMP-1 and MMP-13, which play an important role in cartilage damage [7]. PGD2 was also reported to increase the expression of the cartilage-specific matrix molecules type II collagen and aggrecan [8], and to prevent chondrocyte apoptosis [9].

In addition to its chondroprotective effects, PGD2 has anti-inflammatory properties. For instance, the initiation of inflammation is associated with reduced production of PGD2, while the resolution phase is associated with increased levels of PGD2 [10]. Moreover, PGD2 inhibits several inflammatory responses including the production of IL-12 [11], and interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) [12], and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) [13]. PGD2 was also reported to enhance the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [14]. The anti-inflammatory effect of PGD2 is further supported by studies using PGD2 synthase deficient, and transgenic mice. The knockout animals showed impaired resolution of inflammation, and transgenic animals had little detectable inflammation [15-17].

The biosynthesis of PGD2 is catalyzed by two PGD synthases (PGDSs) that differ in tissue distribution; the lipocalin-type PGDS (L-PGDS), and the hematopoietic PGDS (H-PGDS) [18]. L-PGDS is expressed abundantly in the central nervous system [19], the heart [20],

and skin [21]. H-PGDS is expressed mainly in mast cells [22], megakaryocytes [23] and, T helper (Th) 2 lymphocytes [24].

We have previously shown that articular cartilage predominantly expresses L-PGDS [25, 26]. However, the *in vivo* role of L-PGDS in the pathophysiology of OA remains largely unknown. In this study, we investigated the effect of L-PGDS deficiency on the development of OA using a surgical mouse model, induced by destabilization of the medial meniscus (DMM) [27]. We also evaluated the effect of intra-articular injection of an adeno-associated viral vector (AAV2/5) encoding murine L-PGDS gene on the progression of OA in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Mice**

All animal experiments were approved by the Institutional Animal Protection Committee of the University of Montreal Hospital Research Centre (CRCHUM). L-PGDS<sup>-/-</sup> mice were generated as described previously [28]. In these mice, L-PGDS gene was disrupted by replacing a 1.84-kb fragment containing parts of exons II-V with the neomycin resistance gene. L-PGDS<sup>-/-</sup> mice were backcrossed onto the C57BL/6 background for 10 generations. L-PGDS<sup>-/-</sup> and WT mice used in these experiments were generated by breeding heterozygous littermates, and genotypes were identified by polymerase chain reaction (PCR) of tail biopsy DNA extract. Mice were maintained under 12-hour light/dark cycle, and were freely allowed access to food, water and activity before and after surgery. The mice appeared healthy, and showed normal behavior throughout the study.

### **Induction of OA in mice**

OA was induced by destabilization of the medial meniscus (DMM) in the knee joints of 10-week-old male WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice, as previously described [27]. Briefly, animals were anesthetized, and the right knee joint was destabilized by transection of the anterior attachment of the medial meniscotibial ligament (MMTL). The sham operation involved the same surgery, except that the MMTL was visualized but not transected. Mice were sacrificed at 2, 4, and 8 weeks post-DMM surgery. Knees were harvested, and subjected to micro-CT, histological and immunohistochemical analyses. Only male mice were used *in vivo* in this study because male mice develop better features of the disease. None of the mice died during the experimental period.

### **Histological evaluation of osteoarthritic changes**

The harvested knee joints were fixed in TissuFix (Chaptec, Montreal, QC, Canada), decalcified in 10% EDTA for 14 days at 4°C, and embedded in paraffin. Coronal sections (5-µm) were obtained through the entire joint at 80 µm intervals, and stained with Safranin O-fast green (8 sections per joint) or hematoxylin and eosin (5 sections per joint). Cartilage damage was assessed in accordance with the recommendations of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) guidelines [29]. Synovitis was evaluated using the scoring method described by Lewis et al [30]. All sections were graded by two scorers (MN and YO) in a blinded manner. Scores for cartilage damage, and synovitis were recorded for



the femoral-medial and the tibial-medial condyles on the operated side of the joint, and the scores for the two quadrants regions were summed.

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemical analysis was performed as previously described [31, 32]. For further details, see Supplementary Methods.

### **Isolation of primary chondrocytes and measurement of PGD2 levels**

Primary epiphyseal chondrocytes were isolated from 5- to 6-day-old mice as previously reported [31]. A detailed description of isolation of primary chondrocytes can be found in the Supplementary Methods.

### **RNA extraction and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction**

Total RNA was isolated from whole joints following the removal of the skin and muscle bulk. The joint tissues were homogenized in 1 ml of TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) using a PowerGen 125 Polytron instrument (Fisher Scientific), and RNA was isolated, according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed, and amplified using the QuantiTect Reverse Transcription PCR Kit (QIAGEN) on the Rotor Gene 3000 Realtime PCR system (Corbett Research, Mortlake, Australia), according to the manufacturer's protocol. Relative mRNA expression was determined using the  $\Delta\Delta C_T$  method, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the housekeeping gene. The primer efficiencies were similar for the target and GAPDH genes. All primer sequences are available on request. Each PCR was performed in triplicate from two independent experiments.

**PGD2 assay.** The levels of PGD2 in culture supernatants or in knee joints were determined using the Prostaglandin D2 ELISA kit (Cayman Chemical, MI, USA). For mouse knee joints, skin and muscle were removed from the operated knee and the samples were snap frozen in liquid N<sub>2</sub>, and stored at -80°C until use. The samples were then gently homogenized (PowerGen 125 Polytron instrument, Fisher Scientific) in 1 ml ice-cold buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl, 1mM dithiothreitol, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µg/mL each of aprotinin, leupeptin, and pepstatin, and 10 µM, indomethacin). The homogenates were sonicated on ice and centrifuged at 12,000×g for 15 minutes. The levels of PGD2 in the supernatants

were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cayman Chemical). All samples were analysed in duplicate and at two different dilutions.

### **Culture of cartilage explants**

Femoral heads from 3- to 4-week-old WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice were cultured as explants (4 femoral heads per well) in 48-well plates at 37°C in 400 µl of DMEM containing antibiotics and 10% fetal calf serum for 48 hours. The explants were then washed in serum-free DMEM, and cultured for an additional 72 hours in serum-free DMEM, with and without 10 ng/ml mouse interleukin-1α (IL-1α) (Sigma-Aldrich). Conditioned medium was collected at the end of the culture period and proteoglycan degradation was assessed by measuring the levels of sulfated glycosaminoglycan (GAG) released into culture media using dimethyl methylene blue (DMMB) with chondroitin sulfate as a standard [31]. Results are expressed as µg of GAG released/mg cartilage.

### **Micro-CT analysis of bone**

The knee joints were scanned using the Skyscan 1176 micro-CT scanner (Skyscan, Aartselaar, Belgium) at 50 KV, 149 µA, with a pixel size of 9 µm and a 0.5-mm aluminum filter. Data were recorded at every 3-degree rotation step through 180 degrees. Image slices were reconstructed using NRecon software (version 1.6.3.2, Skyscan). The region of interest (ROI) included the area between the epiphyseal growth plate and articular cartilage. The following morphometric parameters: trabecular bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th.), trabecular separation (Tb.Sp.), trabecular number (Tb.N.), were determined using CT Analyzer software (SkyScan). CTVox software (SkyScan) was used to create 3-D images.

### **Intra-articular injection of AAV2/5 in L-PGDS<sup>-/-</sup> in mice**

Recombinant AAV2/5 vectors encoding either green fluorescent protein GFP alone (AAV2/5-GFP) or L-PGDS-GFP (AAV2/5-L-PGDS-GFP) were generated by Vector BioLabs (Philadelphia, PA, USA). Ten week-old mice were anesthetized, and each right knee was intra-articularly injected with 10 µl of either  $1.3 \times 10^{10}$  gc AAV-GFP or AAV-L-PGDS-GFP. After three days, mice were subjected to sham or DMM surgery. Mice were sacrificed 4 weeks post-surgery, and the joints were harvested, and processed for immunofluorescence and molecular analyses.

## Statistical analysis

Sample size calculations were based on our primary outcome "OA histopathology" and our previous studies [31, 32]. Our sample size would provide >80% power to detect a 50% change in mean OARSI scores with a significance level of  $P = 0.05$ .

Histological and immunohistochemical data were assessed using the Mann-Whitney U test (for comparison of two groups), or Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test (for comparison between more than two groups). Results of the real-time PCR, PGD2 levels and bone parameters were analyzed using Student's t-test (for comparison of two groups) or one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test (for comparison between more than two groups).  $P$ -value < 0.05 was considered significant. All analyses were performed using Prism 8.0 (GraphPad).

## RESULTS

### L-PGDS deficiency enhanced cartilage destruction following DMM surgery

To validate the deletion of L-PGDS, we assessed the expression of L-PGDS mRNA in the knee joints of WT and L-PGDS  $-/-$  mice. As expected, the expression of L-PGDS mRNA was absent in L-PGDS  $-/-$  mice (Suppl. Fig. 1A). In addition, we compared the expression of L-PGDS protein, and the production of PGD2, in response to IL-1 $\alpha$  in cultured chondrocytes from WT and L-PGDS  $-/-$  mice. The results revealed complete absence of L-PGDS expression and PGD2 production in chondrocytes isolated from L-PGDS  $-/-$  mice (Suppl. Fig. 1B, C). These results indicated effective ablation of L-PGDS in L-PGDS  $-/-$  mice.

To evaluate the functional role of L-PGDS in OA *in vivo* we studied the development of DMM-induced OA-related changes in L-PGDS  $-/-$  mice and their WT littermates. DMM surgery was performed, and knee joints were harvested 2, 4, and 8 weeks post-surgery. Histological analyses revealed that cartilage degradation was more severe and more accelerated in L-PGDS  $-/-$  mice compared with WT mice (Fig. 1A). Quantification by the OARSI grading scoring system [29] confirmed the exacerbation and acceleration of cartilage degradation in L-PGDS  $-/-$  mice (Fig. 1B). These results indicated that L-PGDS deletion exacerbates OA development in a surgical mouse OA model.

We also examined synovial inflammation, another feature of OA. We found no difference in synovitis between L-PGDS<sup>-/-</sup> mice and their WT littermates at 2 and 4 weeks after DMM surgery (Fig. 1C). However, synovitis was greater in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice, at 8 weeks post-DMM surgery (Fig. 1C). Semiquantitative scoring [30] confirmed that the scores were significantly higher in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1D). although this was not statistically significant. These findings demonstrated that L-PGDS deletion accelerates both cartilage destruction, and synovial inflammation.

### **Increased expression of cartilage-degrading enzymes and cartilage degradation products in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice**

To elucidate the mechanisms underlying the exacerbation cartilage degradation in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice, we evaluated the expression of key factors in OA development including ADAMTS-5 and MMP-13. Immunohistochemical analysis revealed that the levels of MMP-13 and ADAMTS-5 enzymes were elevated in the joints of both WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 2 weeks post-surgery compared to sham-operated control joints (Fig. 2). This increase was significantly greater in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice than in WT control mice. These results indicate that L-PGDS deletion may enhance cartilage damage by increasing the expression of cartilage degrading enzymes. We also performed immunostaining for type II collagen and aggrecan cleavage fragments. We observed increased staining for C1,2C, VDIPEN, and NITEGE in cartilage from either genotype, though the staining was more intense in the L-PGDS<sup>-/-</sup> mice, compared to wild-type mice (Suppl. Fig. 2). The elevated staining for the degradation products of MMP-13 and ADAMTS-5 in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice suggests increased activity of MMP-13 and ADAMTS-5.

### **L-PGDS deficiency enhanced IL-1 $\alpha$ -induced proteoglycan degradation**

To further define the role of L-PGDS in cartilage degradation, we examined the effect of IL-1 $\alpha$  on proteoglycan degradation in cultured cartilage explants. Femoral head articular cartilage from WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice were treated or not with IL-1 $\alpha$ , and glycosaminoglycan (GAG) release was evaluated using dimethylmethylene blue assay. Treatment with IL-1 $\alpha$  caused a significant increase in GAG release in both WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> cartilage, with the increase being more pronounced in L-PGDS<sup>-/-</sup> cartilage (Fig.

3). In the absence of IL-1 $\alpha$ , there was no significant difference in GAG release between L-PGDS<sup>-/-</sup> mouse cartilage and WT mouse cartilage. These results further support that L-PGDS deletion increases cartilage degradation.

### **L-PGDS deletion exacerbated subchondral bone microarchitectural changes following DMM surgery**

In addition to articular cartilage destruction, subchondral bone changes are believed to play a key role in the pathogenesis of OA. We therefore used micro-CT to evaluate DMM-induced changes in the microarchitecture of subchondral bone of sham- and DMM-operated WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 8 weeks post-surgery. As shown in Fig. 4A, both WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice had subchondral bone sclerosis, which is more prominent in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice. There was also a significant increase in trabecular bone volume BV/TV in DMM-operated knee compared to sham-operated knees control, in both the WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice. Tb.Th also increased in DMM-operated knee joints of WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4B). In line with these changes, there was a decrease in Tb.Sp in DMM-operated knee joints of both genotypes (Fig. 4B). The magnitude of subchondral bone changes was more pronounced in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4B). The 3-D rendering revealed that OA-related bony changes including meniscal calcification, sesamoid bone enlargement, periarticular mineralization, and reduced joint space, which were more prominent in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4C). These results demonstrated that L-PGDS deletion, not only exacerbates cartilage degeneration, and synovitis, but also increases the severity of subchondral changes in experimental OA.

### **Intra-articular injection of AAV2/5-L-PGDS reversed the exacerbation of DMM-induced cartilage damage in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice**

As L-PGDS deletion was found to exacerbate experimental OA, we further investigated whether intra-articular injection of an adeno-associated viral vector (AAV2/5) encoding L-PGDS gene attenuates typical osteoarthritic changes in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice.

Immunohistochemical analysis at 4 weeks post-DMM surgery revealed that AAV-GFP control virus efficiently transduced cells in the cartilage, meniscus and synovium (Fig 5A). Efficient AAV infection was further confirmed by detection of high levels of L-PGDS in

these tissues (Fig 5B). No evidence of L-PGDS expression was seen in the cartilage from knees injected with a control AAV2/5 encoding only GFP (Fig 5B). The level of PGD2 was increased in L-PGDS overexpressing joints, demonstrating successful increased activity of L-PGDS (Fig 5C).

As shown in Fig 5C, the administration of AAV-L-PGDS protected against cartilage loss, and significantly reduced the OARSI scores (Fig 5D). The synovitis score in L-PGDS-injected mice was also significantly lower than in GFP-injected mice (Suppl. Fig. 3). Together, these data support the notion that L-PGDS has protective effects in OA.

### **Increased expression of L-PGDS in OA cartilage of WT mice**

We analyzed the expression level of L-PGDS in knee joints of sham- and DMM-operated WT mice. We observed increased level of L-PGDS mRNA in the joints of DMM-operated mice compared to those of sham-operated animals (Fig. 6A). The level of L-PGDS protein was also higher in cartilage from DMM-operated mice than in cartilage from sham-operated mice (Fig. 6B and C). Control sections showed no staining (data not shown). Consistently, the level of PGD2 was increased in the knee joints of DMM-operated mice relative to sham-operated mice (Fig. 6D). These findings suggested that the up-regulation of L-PGDS is not sufficient to optimally protect against cartilage damage/ in this model.

## **DISCUSSION**

In the present study, we demonstrated for the first time, that L-PGDS deletion accelerates and aggravates DMM-induced OA progression. Compared to their WT littermates, L-PGDS<sup>-/-</sup> mice displayed enhanced cartilage degradation, synovial inflammation, and subchondral bone alterations. These changes were associated with increased expression of cartilage matrix-degrading enzymes MMP-13 and ADAMTS-5 and their ECM degradation products. Finally, we found that enforced intra-articular overexpression of L-PGDS attenuated the severity of cartilage degradation in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice. These findings suggest a protective role of L-PGDS in OA, thus enhancing its expression/activity may constitute a new therapeutic strategy in the treatment of OA.

To define the functional role of L-PGDS in OA, we studied the course of DMM-induced OA in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice and their WT littermates. We found that the extent of cartilage

damage seen in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice was significantly increased compared to WT mice. In addition, the levels of MMP-13 and ADAMTS-5 enzymes were enhanced in the joints of both WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 2 weeks post-surgery, with the increase being significantly greater in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice. The elevated staining for the degradation products of MMP-13 and ADAMTS-5 in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice suggests increased activity of MMP-13 and ADAMTS-5. These findings were corroborated in *ex vivo* cartilage explant studies showing a significant increase in IL-1-induced proteoglycan release in cartilage from L-PGDS<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice.

Collectively, these data suggest that L-PGDS deletion exacerbates cartilage damage by enhancing MMP-13 and ADAMTS-5 expression. This is also consistent with our previous study showing that PGD2 and 15d-PGJ2, the main products of L-PGDS, prevent MMP-1 and MMP-13 production in cultured chondrocytes [7, 33].

Another important finding of this study was that L-PGDS<sup>-/-</sup> mice had increased synovitis compared to WT mice at 8 weeks post-surgery. This is likely related to the anti-inflammatory properties of L-PGDS, and is in agreement with previous studies in which injection of PGD2 reduced synovial inflammation, and joint damage in murine collagen-induced arthritis [14]. 15d-PGJ2, another end product of L-PGDS, has also been reported to reduce synovitis in collagen-induced arthritis in mice [34], and adjuvant-induced arthritis in rats [35]. Further studies have demonstrated that PGD2 attenuates inflammation in a number of experimental models including atopic dermatitis [36] and colitis [37]. Moreover, L-PGDS deletion was reported to exacerbate atherosclerosis and nephropathy [17, 38].

Subchondral bone changes are another critical feature of OA pathogenesis in OA patients and in animal models of OA. Micro-CT assessment of the subchondral bone in WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mouse knee joints revealed subchondral bone sclerosis, increased BV/TV and TbTh, and ectopic bone formation at 8 weeks post-surgery. These impairments were, however, more pronounced in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice. This is likely due to the importance of PGD2 in bone remodeling [39, 40]. Thus, in addition to cartilage degeneration and synovitis, L-PGDS deficiency also increased the magnitude of subchondral changes. Articular cartilage and the underlying bone operate as a functional unit in the joint, and crosstalk between both tissues compartments is believed to play an important role in the onset and progression of OA. Given that the mice used in our study

are global constitutive KO and that L-PGDS is expressed in both cartilage and bone, we cannot determine whether the effect of L-PGDS deletion was due to alteration in cartilage or bone and their hierarchical role in the severity of OA osteoarthritis are areas for further investigation.

Having demonstrated that L-PGDS deletion exacerbated OA-like changes, we assessed the effect of L-PGDS overexpression in the joint on the course of OA in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice. We found that intra-articular administration of an AAV2/5 encoding L-PGDS reversed the severity of cartilage degradation confirming the protective role of L-PGDS. We also found that Intraarticular injection of AAV2/5-LPGDS attenuated DMM-induced cartilage degradation in WT mice (data not shown). Interestingly, the protective effect of L-PGDS overexpression was associated with increased level of PGD<sub>2</sub>, suggesting that enhanced production of PGD<sub>2</sub> is the likely mechanism by which L-PGDS overexpression attenuates cartilage degradation. This is in accordance with our previous findings showing that treatment with BW245C, an agonist of the PGD<sub>2</sub> receptor DP1, protects against OA and that DP1 deletion exacerbates murine experimental OA [31].

Finally, we showed that L-PGDS expression is elevated in the cartilage of DMM-operated WT. This is consistent with our previous studies showing enhanced levels of L-PGDS in human [25], guinea pig and dog [26] OA cartilage. These findings suggested that although protective, up-regulation of endogenous L-PGDS might not be high strong enough to prevent the development of OA/attenuate limit cartilage damage in this model.

It is also well known that the dehydration product of PGD<sub>2</sub>, 15d-PGJ<sub>2</sub>, exerts anti-inflammatory effects through either PPAR- $\gamma$ -dependent or PPAR- $\gamma$ -independent pathways. We have previously shown that 5d-PGJ<sub>2</sub> or PPAR- $\gamma$  agonists negatively regulate the expression of a number of inflammatory and catabolic events in culture chondrocytes and synovial fibroblasts [41]. Moreover, we have demonstrated that PPAR  $\gamma$  deficiency in mice accelerates experimental OA [42]. Additional studies demonstrated that administration of 15d-PGJ<sub>2</sub> attenuates the severity of collagen-induced arthritis in mice [34], and adjuvant-induced arthritis in rats [35]. Thus, L-PGDS deletion may inhibit downstream PGD<sub>2</sub> and 15-PGJ<sub>2</sub> production in the joint, resulting in enhanced inflammatory and catabolic responses and subsequent exacerbation acceleration of OA progression.



In addition to its ability to catalyze the production of PGD<sub>2</sub>, and 15d-PGJ<sub>2</sub>, L-PGDS is also involved in the binding and transport of small lipophilic molecules, known for their implication in the pathophysiology of OA, like retinoids [43], thyroid hormones [21], and gangliosides [44]. Therefore, it is possible that the lack of L-PGDS will exacerbate OA by disrupting the availability and transport of these lipophilic molecules and/or altering their downstream signalling pathways.

One limitation of our study is that although we demonstrated that L-PGDS deletion aggravates instability-induced OA, we did not evaluate the effect of L-PGDS deletion on the progression of OA during aging, which is also relevant to the pathogenesis of OA. Additionally, we did not investigate the effect of L-PGDS deletion on OA-related pain behavior. Previous studies reported anti-nociceptive effects of PGD<sub>2</sub>. For example, Minami et al. showed that treatment with PGD<sub>2</sub> prevents PGE<sub>2</sub> induced allodynia [45], and nociceptin evoked hyperalgesia [46]. The anti-nociceptive effect of PGD<sub>2</sub> is corroborated by the finding of Telleria-Diaz [47], who showed that topical application of PGD<sub>2</sub> to the spinal cord of rats with inflamed knee joints decreased responses to mechanical stimulation. Other studies, however, reported pro-nociceptive effects of PGD<sub>2</sub>. For instance, PGE<sub>2</sub>-induced allodynia was attenuated in L-PGDS<sup>-/-</sup> mice [28], and PGD<sub>2</sub> was reported to induce hyperalgesia and allodynia [48]. Further studies are required to define the exact role of PGD<sub>2</sub> and L-PGDS in OA-related pain.

Inhibition of prostaglandin production by traditional NSAIDs, COX-2 specific inhibitors, and corticosteroids and have been widely used clinically for the symptomatic management of OA, however, their effects on the structural progression of disease remains controversial (Refs). Our findings that L-PGDS/PGD<sub>2</sub> has anti-OA effects, suggest that inhibition of endogenous PGD<sub>2</sub> biosynthesis may partially explain the lack of long-term disease-modifying activity in patients receiving these drugs and underline the limits of therapeutic approaches that inhibit the production of all prostaglandins.

## **Conclusion**

Our findings suggest a protective role of L-PGDS in OA. They also suggest that enhancing the level of L-PGDS could be an attractive new strategy for the treatment of OA.

## Acknowledgements

We would also like to thank members (the managers, veterinarians, and animal caretakers) at the CRCHUM animal facility for their assistance, and for maintaining the mice for this study. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP-130293. Y. Ouhaddi was supported by a fellowship from La Chaire en Arthrose de l'Université de Montréal

## Reference:

1. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB: Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012, 64(6):1697-1707.
2. Wei Y, Bai L: Recent advances in the understanding of molecular mechanisms of cartilage degeneration, synovitis and subchondral bone changes in osteoarthritis. *Connect Tissue Res* 2016, 57(4):245-261.
3. Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T *et al*: Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001, 107(1):35-44.
4. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, Shah M, Thompson EW: Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 2009, 60(12):3723-3733.
5. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z *et al*: Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005, 434(7033):644-648.
6. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK *et al*: ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005, 434(7033):648-652.
7. Zayed N, Afif H, Chabane N, Mfuna-Endam L, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Motiani RK, Trebak M, Duval N *et al*: Inhibition of interleukin-1beta-

- induced matrix metalloproteinases 1 and 13 production in human osteoarthritic chondrocytes by prostaglandin D(2). *Arthritis Rheum* 2008, 58(11):3530-3540.
8. Jakob M, Demarteau O, Suetterlin R, Heberer M, Martin I: Chondrogenesis of expanded adult human articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins. *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43(7):852-857.
  9. Relic B, Benoit V, Franchimont N, Ribbens C, Kaiser MJ, Gillet P, Merville MP, Bours V, Malaise MG: 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits Bay 11-7085-induced sustained extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and apoptosis in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 2004, 279(21):22399-22403.
  10. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA: Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999, 5(6):698-701.
  11. Theiner G, Gessner A, Lutz MB: The mast cell mediator PGD2 suppresses IL-12 release by dendritic cells leading to Th2 polarized immune responses in vivo. *Immunobiology* 2006, 211(6-8):463-472.
  12. Torres D, Paget C, Fontaine J, Mallevaey T, Matsuoka T, Maruyama T, Narumiya S, Capron M, Gosset P, Faveeuw C *et al*: Prostaglandin D2 inhibits the production of IFN-gamma by invariant NK T cells: consequences in the control of B16 melanoma. *J Immunol* 2008, 180(2):783-792.
  13. Nagoshi H, Uehara Y, Kanai F, Maeda S, Ogura T, Goto A, Toyooka T, Esumi H, Shimizu T, Omata M: Prostaglandin D2 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998, 82(2):204-209.
  14. Maicas N, Ibanez L, Alcaraz MJ, Ubeda A, Ferrandiz ML: Prostaglandin D2 regulates joint inflammation and destruction in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2012, 64(1):130-140.
  15. Trivedi SG, Newson J, Rajakariar R, Jacques TS, Hannon R, Kanaoka Y, Eguchi N, Colville-Nash P, Gilroy DW: Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of delayed type hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(13):5179-5184.

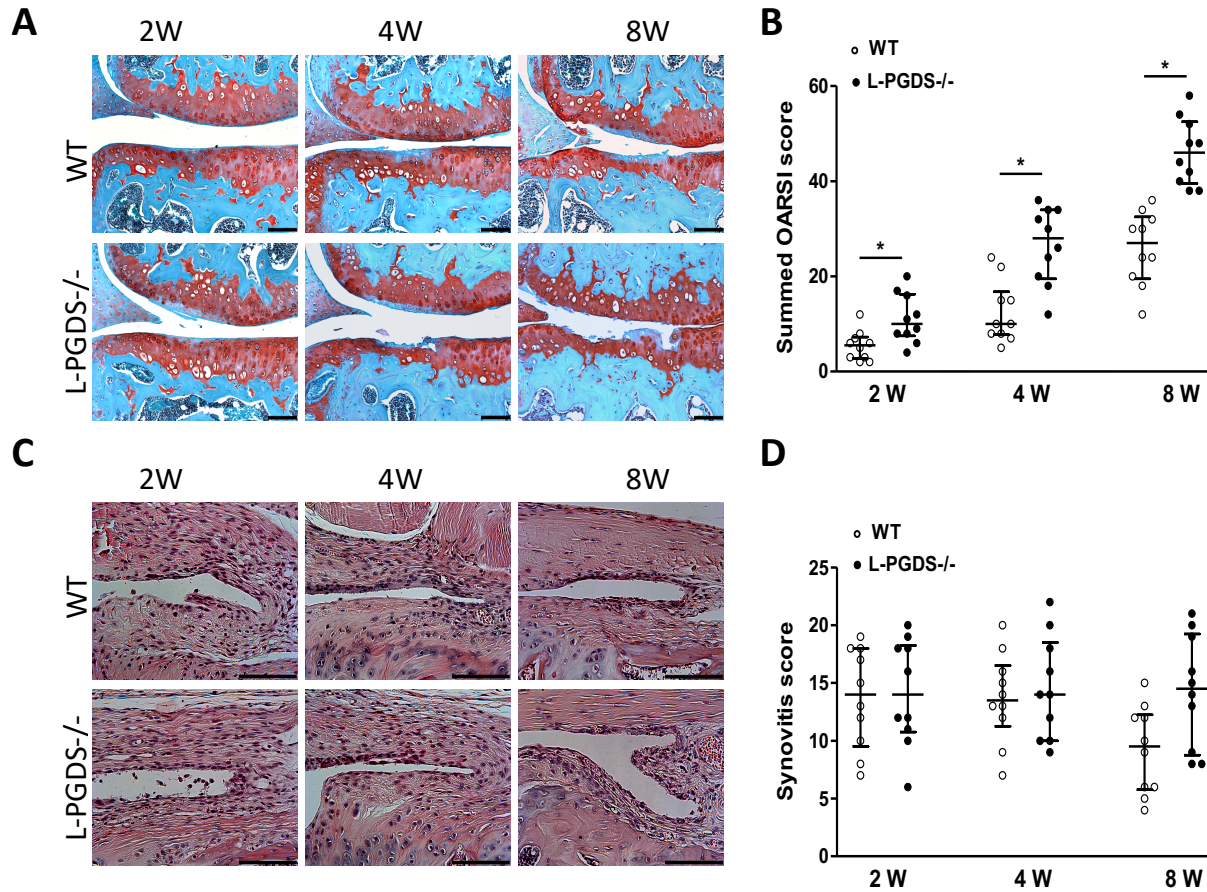
16. Murata T, Aritake K, Tsubosaka Y, Maruyama T, Nakagawa T, Hori M, Hirai H, Nakamura M, Narumiya S, Urade Y *et al*: Anti-inflammatory role of PGD2 in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110(13):5205-5210.
17. Tanaka R, Miwa Y, Mou K, Tomikawa M, Eguchi N, Urade Y, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Wake N, Sasaguri T: Knockout of the l-pgds gene aggravates obesity and atherosclerosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 378(4):851-856.
18. Urade Y, Eguchi N: Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002, 68-69:375-382.
19. Urade Y, Fujimoto N, Hayaishi O: Purification and characterization of rat brain prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* 1985, 260(23):12410-12415.
20. Eguchi Y, Eguchi N, Oda H, Seiki K, Kijima Y, Matsu-ura Y, Urade Y, Hayaishi O: Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(26):14689-14694.
21. Beuckmann CT, Gordon WC, Kanaoka Y, Eguchi N, Marcheselli VL, Gerashchenko DY, Urade Y, Hayaishi O, Bazan NG: Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is located in pigment epithelial cells of rat retina and accumulates within interphotoreceptor matrix. *J Neurosci* 1996, 16(19):6119-6124.
22. Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, Igarashi M, Nagata A, Ikai K, Hayaishi O: Mast cells contain spleen-type prostaglandin D synthetase. *J Biol Chem* 1990, 265(1):371-375.
23. Fujimori K, Kanaoka Y, Sakaguchi Y, Urade Y: Transcriptional activation of the human hematopoietic prostaglandin D synthase gene in megakaryoblastic cells. Roles of the oct-1 element in the 5'-flanking region and the AP-2 element in the untranslated exon 1. *J Biol Chem* 2000, 275(51):40511-40516.
24. Tanaka K, Ogawa K, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K: Cutting edge: differential production of prostaglandin D2 by human helper T cell subsets. *J Immunol* 2000, 164(5):2277-2280.

25. Zayed N, Li X, Chabane N, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Fahmi H: Increased expression of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther* 2008, 10(6):R146.
26. Nebbaki SS, El Mansouri FE, Afif H, Kapoor M, Benderdour M, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Fahmi H: Expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha, beta, gamma, and H- and L-prostaglandin D synthase during osteoarthritis in the spontaneous hartley guinea pig and experimental dog models. *J Rheumatol* 2013, 40(6):877-890.
27. Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA: The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 2007, 15(9):1061-1069.
28. Eguchi N, Minami T, Shirafuji N, Kanaoka Y, Tanaka T, Nagata A, Yoshida N, Urade Y, Ito S, Hayaishi O: Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(2):726-730.
29. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB: The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 2010, 18 Suppl 3:S17-23.
30. Lewis JS, Hembree WC, Furman BD, Tippets L, Cattel D, Huebner JL, Little D, DeFrate LE, Kraus VB, Guilak F *et al*: Acute joint pathology and synovial inflammation is associated with increased intra-articular fracture severity in the mouse knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2011, 19(7):864-873.
31. Ouhaddi Y, Nebbaki SS, Habouri L, Afif H, Lussier B, Kapoor M, Narumiya S, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Benderdour M *et al*: Exacerbation of Aging-Associated and Instability-Induced Murine Osteoarthritis With Deletion of D Prostanoid Receptor 1, a Prostaglandin D2 Receptor. *Arthritis Rheumatol* 2017, 69(9):1784-1795.
32. Habouri L, El Mansouri FE, Ouhaddi Y, Lussier B, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Benderdour M, Fahmi H: Deletion of 12/15-lipoxygenase accelerates the development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2017, 25(10):1719-1728.
33. Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J: Peroxisome proliferator--activated receptor gamma activators inhibit interleukin-

- 1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001, 44(3):595-607.
34. Cuzzocrea S, Wayman NS, Mazzon E, Dugo L, Di Paola R, Serraino I, Britti D, Chatterjee PK, Caputi AP, Thiemermann C: The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Mol Pharmacol* 2002, 61(5):997-1007.
  35. Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H: 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 2000, 106(2):189-197.
  36. Angeli V, Staumont D, Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P, Pichavant M, Lambrecht BN, Capron M, Dombrowicz D, Trottein F: Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol* 2004, 172(6):3822-3829.
  37. Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL: Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 279(1):G238-244.
  38. Ragolia L, Palaia T, Hall CE, Maesaka JK, Eguchi N, Urade Y: Accelerated glucose intolerance, nephropathy, and atherosclerosis in prostaglandin D2 synthase knock-out mice. *J Biol Chem* 2005, 280(33):29946-29955.
  39. Gallant MA, Samadfam R, Hackett JA, Antoniou J, Parent JL, de Brum-Fernandes AJ: Production of prostaglandin D(2) by human osteoblasts and modulation of osteoprotegerin, RANKL, and cellular migration by DP and CRTH2 receptors. *J Bone Miner Res* 2005, 20(4):672-681.
  40. Yue L, Haroun S, Parent JL, de Brum-Fernandes AJ: Prostaglandin D(2) induces apoptosis of human osteoclasts through ERK1/2 and Akt signaling pathways. *Bone* 2014, 60:112-121.
  41. Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J: PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses on arthritis. An overview. *J Rheumatol* 2002, 29:3-14.

42. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, Blati M, Fahmi H, Lussier B, Roughley P, Lagares D, Endisha H, Saffar B *et al*: PPARgamma deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2015, 74(3):569-578.
43. Tanaka T, Urade Y, Kimura H, Eguchi N, Nishikawa A, Hayaishi O: Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J Biol Chem* 1997, 272(25):15789-15795.
44. Mohri I, Taniike M, Okazaki I, Kagitani-Shimono K, Aritake K, Kanekiyo T, Yagi T, Takikita S, Kim HS, Urade Y *et al*: Lipocalin-type prostaglandin D synthase is up-regulated in oligodendrocytes in lysosomal storage diseases and binds gangliosides. *J Neurochem* 2006, 97(3):641-651.
45. Minami T, Okuda-Ashitaka E, Mori H, Ito S, Hayaishi O: Prostaglandin D2 inhibits prostaglandin E2-induced allodynia in conscious mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 278(3):1146-1152.
46. Minami T, Okuda-Ashitaka E, Nishizawa M, Mori H, Ito S: Inhibition of nociceptin-induced allodynia in conscious mice by prostaglandin D2. *Br J Pharmacol* 1997, 122(4):605-610.
47. Telleria-Diaz A, Ebersberger A, Vasquez E, Schache F, Kahlenbach J, Schaible HG: Different effects of spinally applied prostaglandin D2 on responses of dorsal horn neurons with knee input in normal rats and in rats with acute knee inflammation. *Neuroscience* 2008, 156(1):184-192.
48. Minami T, Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O: Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin E2 to conscious mice. *Pain* 1994, 57(2):217-223.

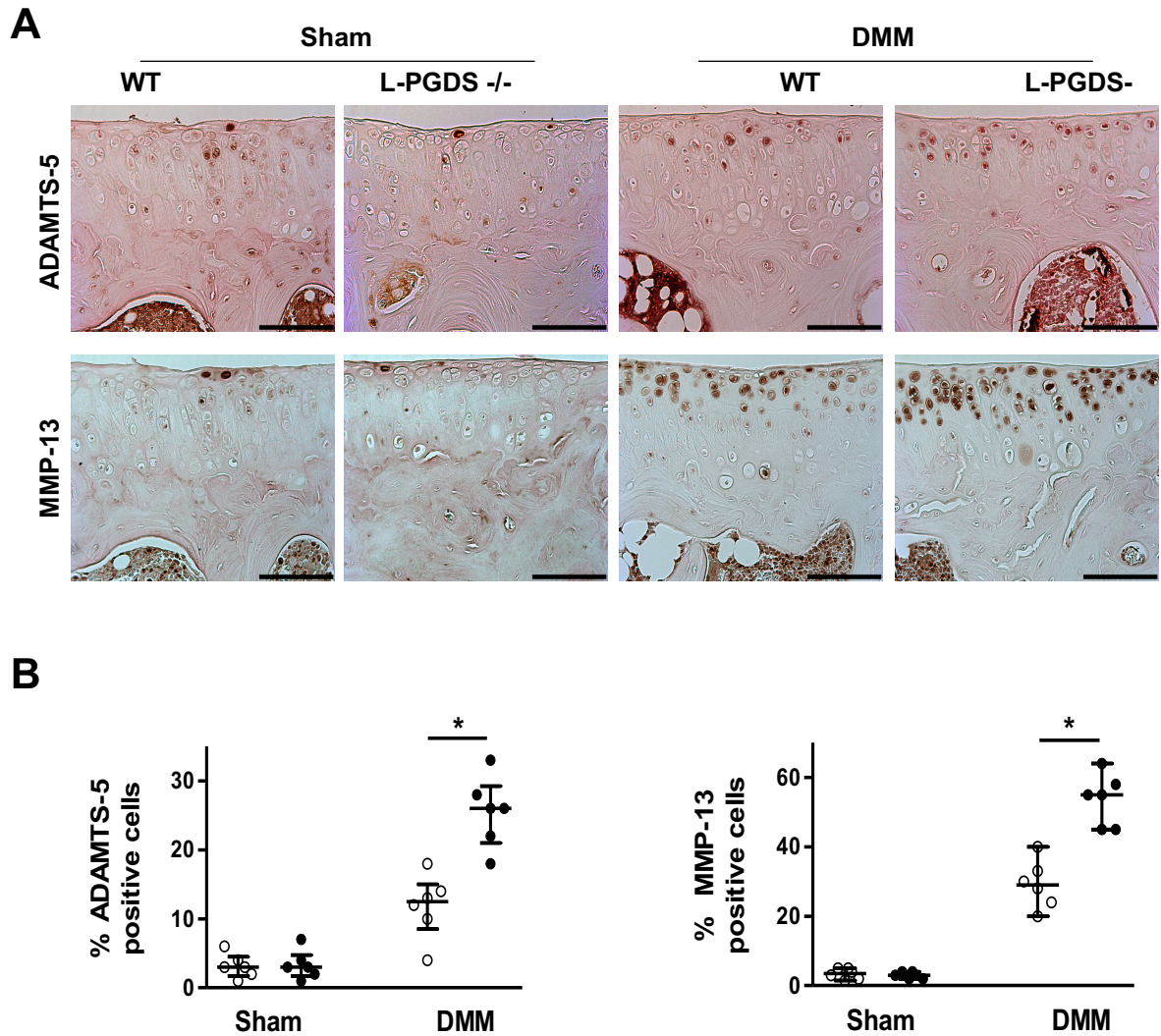
**FIGURE LEGENDS:**



**Figure 1. L-PGDS deletion exacerbated OA following DMM surgery**

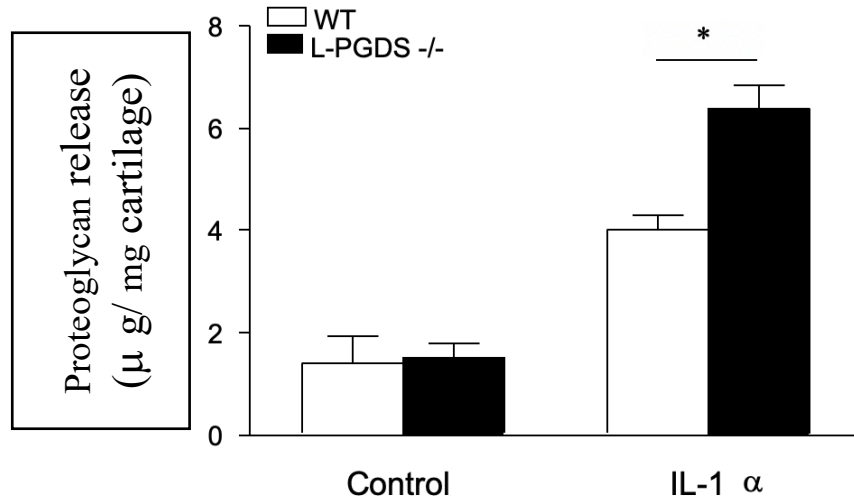
Ten-week-old WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice (n = 10 mice/genotype/time point) were subjected to DMM surgery. Knee joint samples were harvested 2, 4, or 8 weeks post-surgery, prepared and stained with Safranin O–fast green (to assess the extent of articular cartilage degeneration) or hematoxylin and eosin (to assess synovium changes). **(A)** Representative Safranin O staining, and **(B)** summed histologic scores for medial femorotibial joints of WT (open symbols) and L-PGDS<sup>-/-</sup> (filled symbols) mice at 2, 4, and 8 weeks after DMM surgery. **(C)** Representative hematoxylin and eosin staining, and **(D)** quantification of the synovial inflammation in knee joints. The representative sections were selected based on the average score from each experimental group. Results are presented as median with interquartile range. \*P<0.05 versus WT mice.





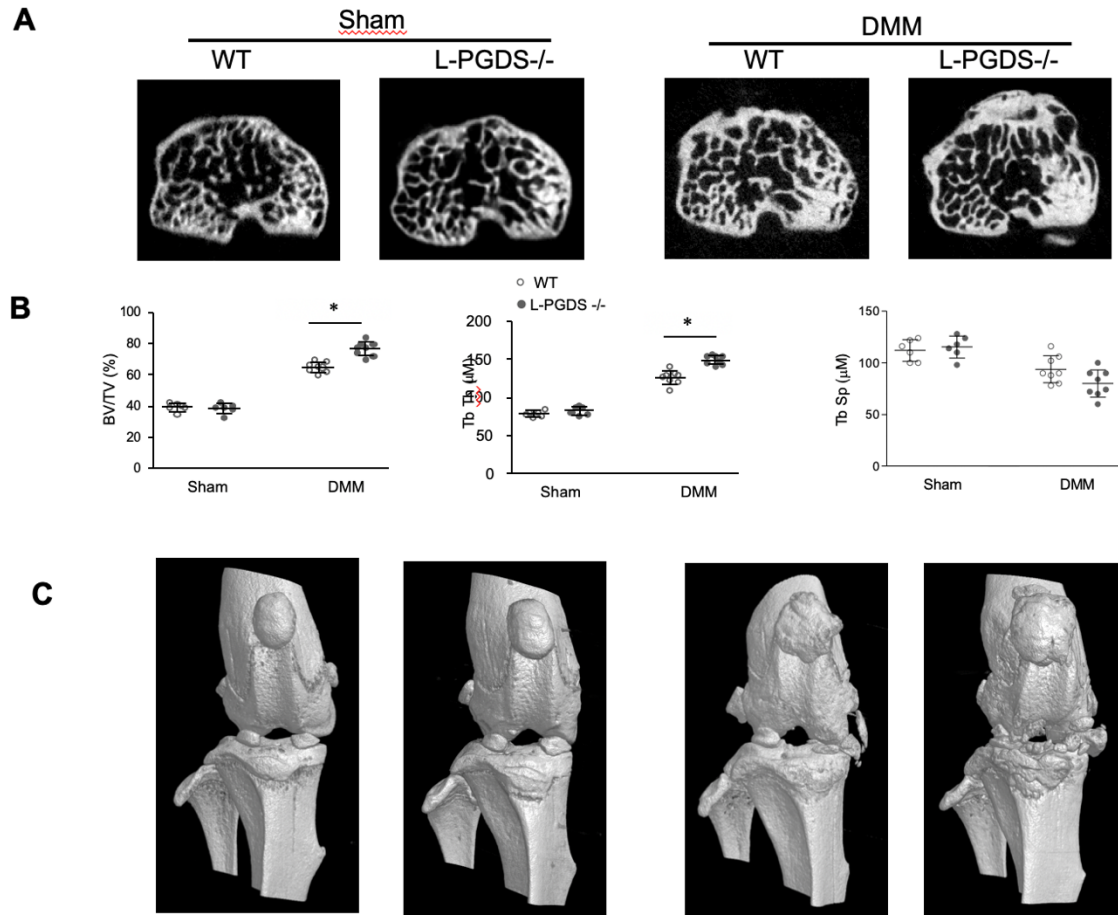
**Figure 2. Expression of ADAMTS-5, and MMP-13 in the knee joints of WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 2 weeks post-DMM surgery**

**A)** Representative images of immunohistochemical staining for ADAMTS5, and MMP-13 in knee joints from sham- (n = 6) and DMM-operated mice (n = 6) at 2 weeks post-surgery. **B)** Percentage of chondrocytes expressing ADAMTS5, and MMP-13 in WT (open symbols) and L-PGDS<sup>-/-</sup> (filled symbols) mice (n = 6 per genotype). Data are presented as median with interquartile range of each group. \*P<0.05 versus WT mice.



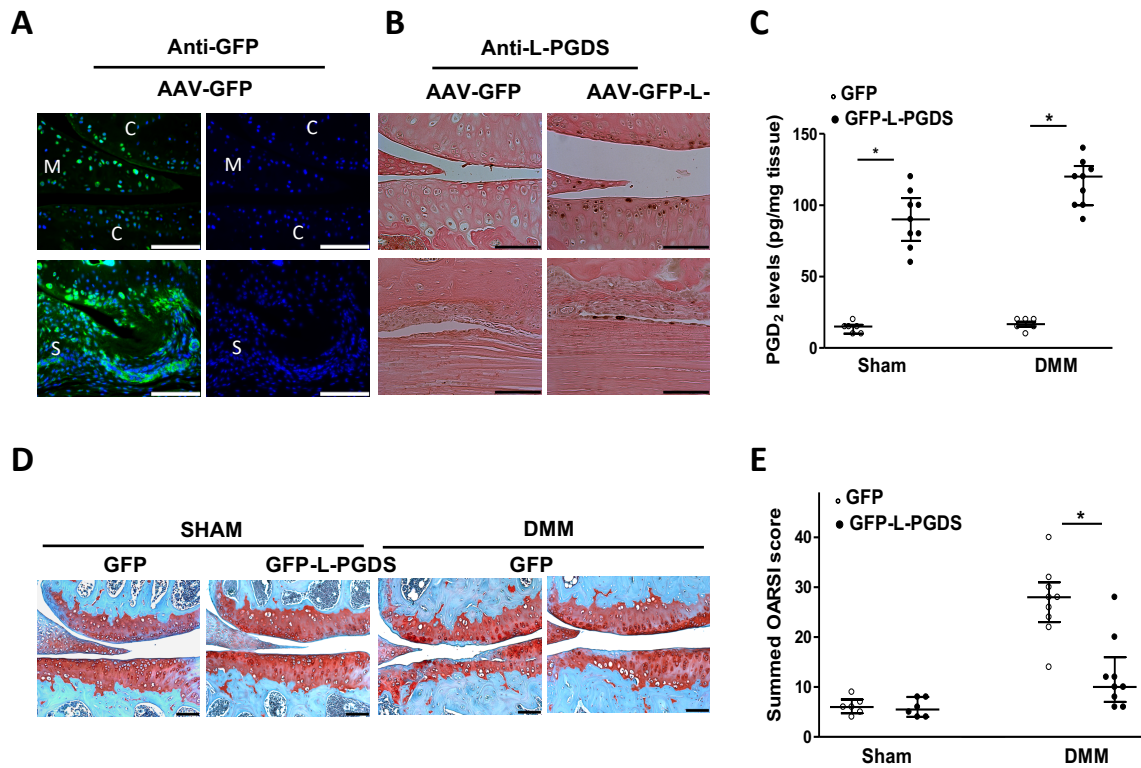
**Figure 3. L-PGDS deletion enhanced IL-1 $\alpha$ -induced proteoglycan degradation in cultured cartilage explants.**

Femoral heads from 3- to 4-week-old WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice were cultured as explants (4 femoral heads (2 mice) per well) in 48-well plates and were stimulated with 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  for 72 h. Proteoglycan degradation in conditioned media from cultured explants was evaluated using dimethyl methylene blue assay). Data are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*P<0.05 versus WT mice.



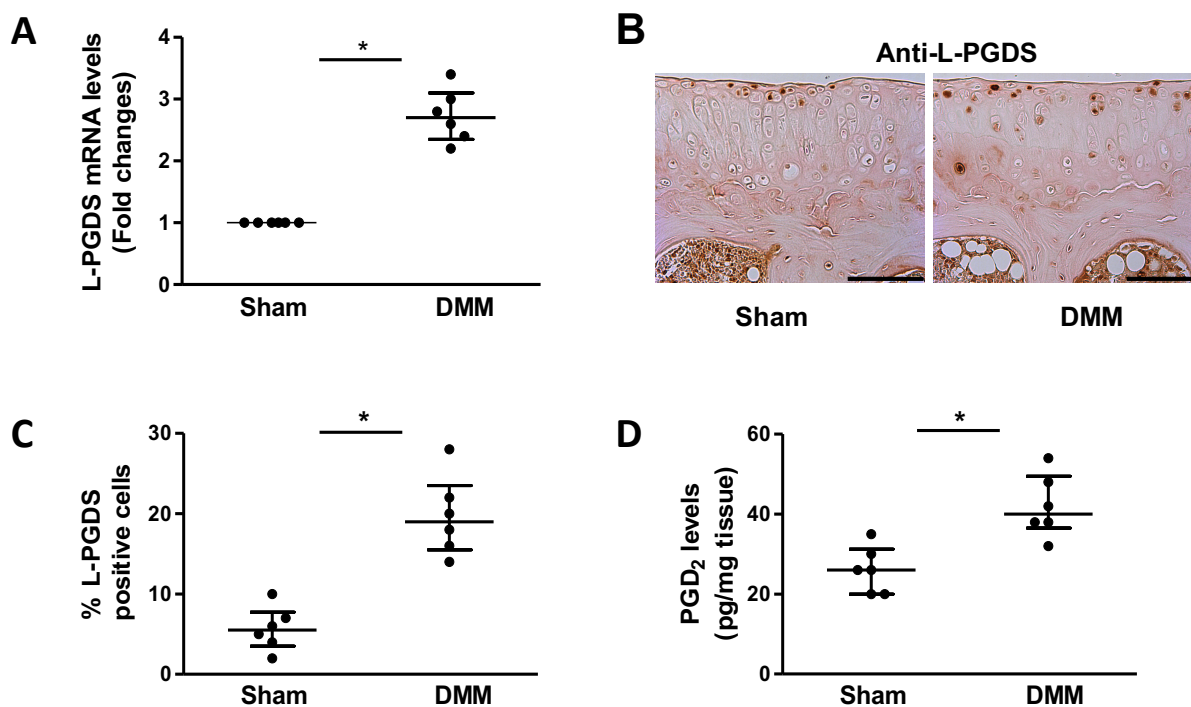
**Figure 4. Micro-CT analysis of the subchondral bone of the tibial plateau of WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 8 weeks post-DMM surgery.**

Knee joints from sham- (n = 6 mice per genotype) and DMM-operated (n = 10 mice per genotype) WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice were evaluated by micro-CT at 8 weeks post-surgery. **A)** Representative axial micro-CT images of the subchondral bone compartment. **B)** Quantification of BV/TV, Tb.Th, and Tb.Sp in the subchondral bone region of the medial tibial plateau. Data are presented as mean mean  $\pm$  SD. **C)** Representative 3D reconstructions of the knee joints of sham- and DMM-operated WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice.



**Figure 5. AAV2/5-mediated L-PGDS expression in the joint attenuated DMM-induced OA progression in L-PGDS  $-/-$  mice.**

Ten-week-old L-PGDS $-/-$  mice were intra-articularly injected with AAV2/5-GFP or AAV2/5-L-PGDS-GFP (n = 15 per group). Three days later, mice were subjected to sham (n = 6) or DMM (n = 9) surgery. Mice were sacrificed 4 weeks after DMM surgery, and the joints were processed for immunohistochemistry and histology. **A)** GFP expression was determined by fluorescence microscopy. Nuclei were detected by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining (left). **B)** L-PGDS expression was determined by immunostaining. **C)** PGD<sub>2</sub> levels in knee joint of sham- and DMM-operated WT mice, as tested by ELISA. **D)** Representative Safranin O-fast green stained histological sections and **(E)** respective OARSI score for medial femorotibial joints. Scale bars = 100  $\mu$ m. Results are presented as median with interquartile range. \*P<0.05 versus WT mice. C, cartilage; M, meniscus; S, synovium.



**Figure 6. Increased expression of L-PGDS in mouse OA cartilage.**

A) Total RNA was extracted from the joints of sham- (n = 6) and DMM-operated (n = 6) WT mice at 2 weeks post-surgery, and the levels of L-PGDS mRNA was determined by real-time RT-PCR. Results are expressed as -fold change, considering 1 as the value of sham-operated mice. B) Representative images of immunohistochemical staining for L-PGDS in knee joints from sham- (n = 6) and DMM-operated mice (n = 6) at 2 weeks post-surgery. Scale bars = 100 mm. C) Percentage of chondrocytes expressing L-PGDS in sham- and DMM-operated cartilage. D) PGD<sub>2</sub> levels in knee joint of sham-(n = 6) and DMM-operated WT (n = 6) mice at 2 weeks post-surgery, as determined by ELISA. Results are presented as median with interquartile range. \*P<0.05 versus sham-operated mice.

## SUPPLEMENTARY METHODS

### Immunohistochemistry

Knee joints from sham- and DMM-operated mice were fixed in TissuFix, decalcified in 10% EDTA for 14 days at 4°C, and embedded in paraffin. Immunohistochemical analysis was performed as previously described [1, 2]. Briefly, sections (4 sections per joint) from the weight bearing area were pre-incubated with chondroitinase ABC (0.25 U/ml in PBS

pH 8.0) for 60 min at 37°C, followed by a 30 min incubation with Triton X-100 (0.3%) at room temperature. Slides were then washed in phosphate-buffered saline (PBS) followed by 2% hydrogen peroxide/PBS for 15 min. They were further incubated for 45 min with 2% normal serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and overlaid with the primary antibody for 18 hours at 4°C in a humidified chamber. The following antibodies were used: rabbit polyclonal anti-L-PGDS (1:200 dilution; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), rabbit polyclonal anti-ADAMTS5 (1:100 dilution; Cedarlane, Hornby, ON), rabbit polyclonal anti-MMP-13 (1:100 dilution; Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-C1,2C (1:500 dilution; IBEX Technologies, Mont-Royal, QC, Canada), rabbit polyclonal anti-VDIPEN (1:500 dilution; Hospital for Children, McGill University Hospital Centre, Montreal, Quebec, Canada), and rabbit polyclonal anti-NITEG (1:100 dilution; Novus Biologicals, Littleton, CO). Each slide was washed 3 times in PBS (pH 7.4) and incubated with a secondary antibody using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) following the manufacturer's instructions. The color was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Vector Laboratories) containing hydrogen peroxide. The slides were counterstained with eosin. The specificity of the staining was confirmed by substituting the primary antibody with a non-specific IgG from the same host as the primary antibody.

For ADAMTS-5, MMP-13 and NITEG staining, the total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive were evaluated and results were expressed as the percentage of chondrocytes staining positive (cell score). For C1,2C and VDIPEN staining, images were captured at 250X with a Leitz Diaplan microscope connected to BIOQUANT OSTEO 2012 software. Surface area of positively stained extracellular cartilage matrix was measured and data expressed as % of positive stained area over total area. Each slide was examined and scored by 2 independent observers (MN and YO), who were blinded to group allocation.

For IHC analysis of GFP protein, sections were incubated with 50 mM ammonium chloride pH 7.6 for 10 minutes at RT to block autofluorescence. Sections were washed with PBS, treated with Triton X-100 (0.3%) at room temperature and incubated with goat serum for 45 min at room temperature. Section were then incubated with a rabbit polyclonal anti-



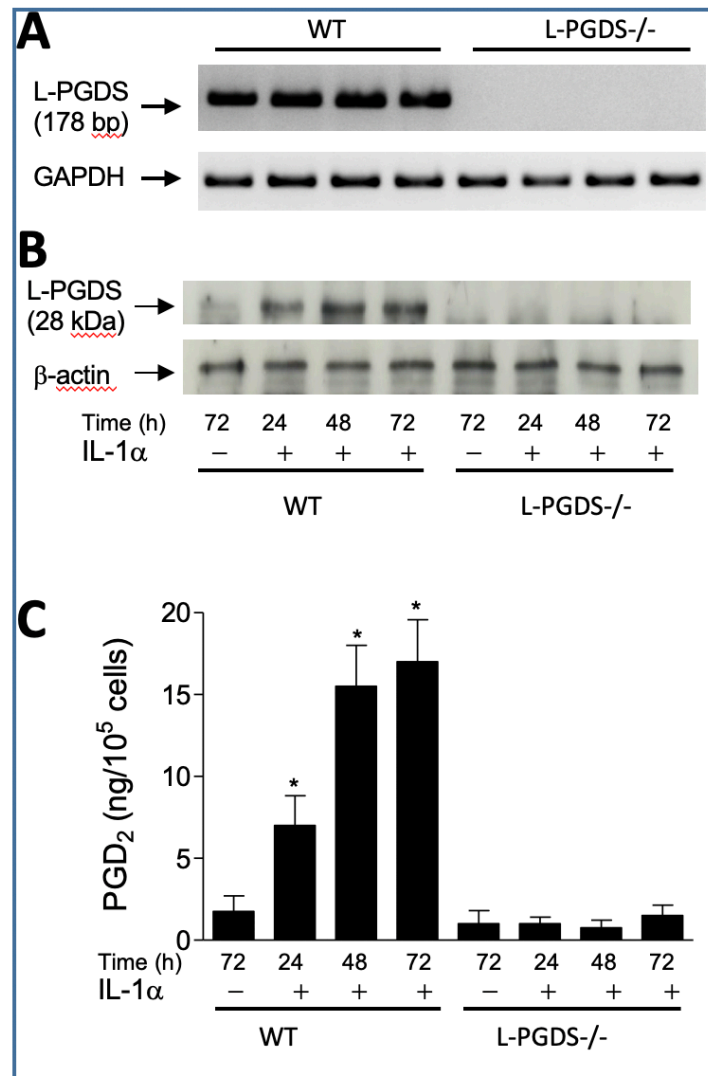
GFP (1:1000 dilution; Abcam, Toronto, ON, Canada) overnight at 4°C. The next day, sections were washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:400; Invitrogen). The nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies).

### **Isolation of primary chondrocytes**

Primary epiphyseal chondrocytes were isolated from 5- to 6-day-old mice as previously reported [3]. Briefly, cartilage tissues, including the femoral heads, femoral condyles and tibial plateaus, were digested twice for 45 min each with 3 mg/ml collagenase D. Then, the cartilage pieces were incubated with 0.5 mg/ml collagenase D at 37°C in a thermal incubator with 5% CO<sub>2</sub> overnight. The cell suspension was filtered through a 70-µm cell strainer and the released cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At confluence, the cells were detached, plated in 24-well plates (2 x 10<sup>5</sup>/well), and stimulated with IL-1β. The expression of L-PGDS was analyzed by immunoblotting and PGD2 was measured by ELISA. Only first-passage cells were used for the experiments.

1. Ouhaddi, Y., et al., *Exacerbation of Aging-Associated and Instability-Induced Murine Osteoarthritis With Deletion of D Prostanoid Receptor 1, a Prostaglandin D2 Receptor*. *Arthritis Rheumatol*, 2017. **69**(9): p. 1784-1795.
2. Habouri, L., et al., *Deletion of 12/15-lipoxygenase accelerates the development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017. **25**(10): p. 1719-1728.
3. Gosset, M., et al., *Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(8): p. 1253-60.

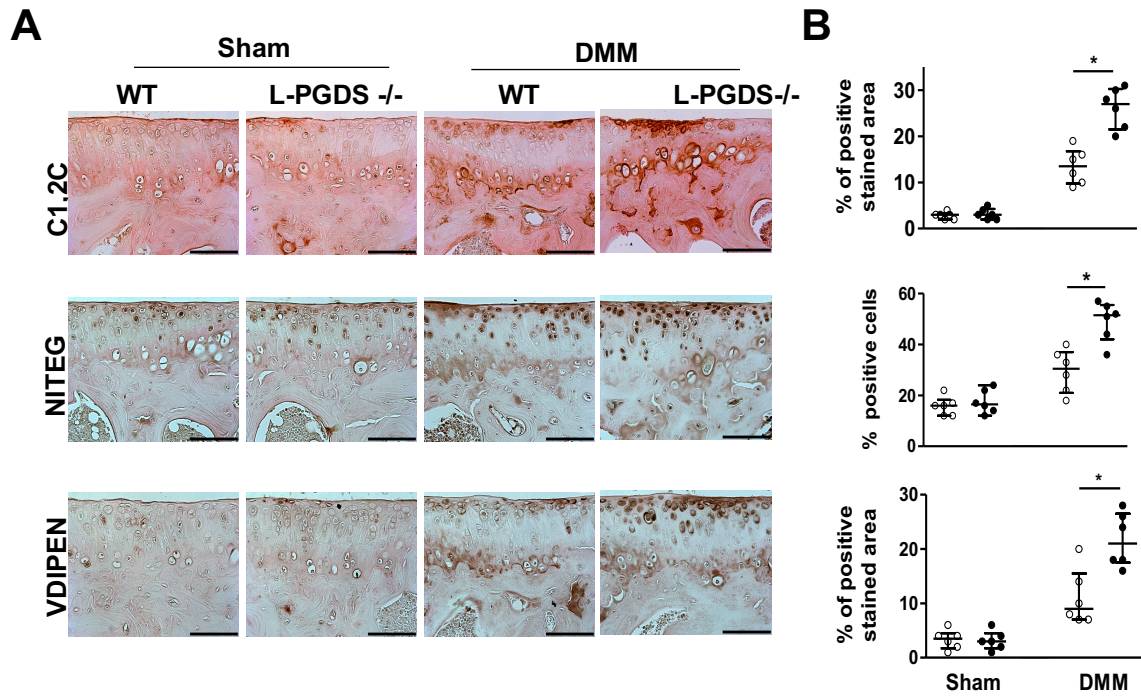
## Supplemental figures



### Supplemental Figure 1. Effective deletion of L-PGDS in L-PGDS<sup>-/-</sup> chondrocytes

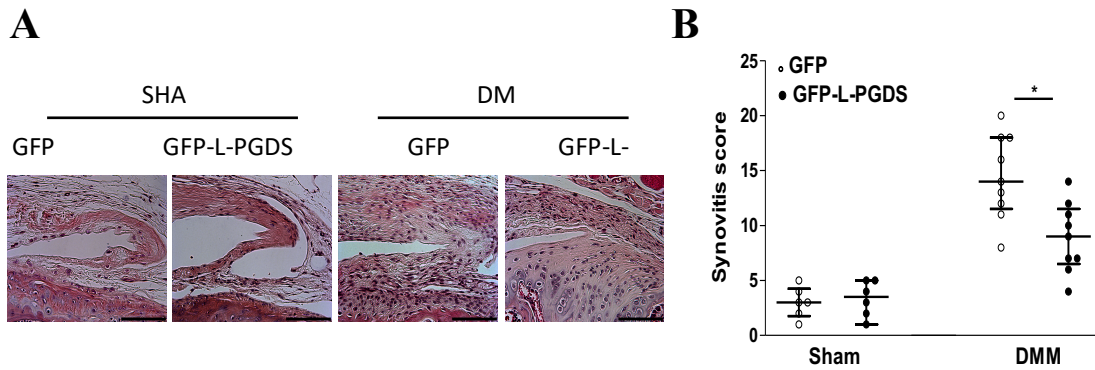
**A)** Total RNA was extracted from the joints of L-PGDS<sup>-/-</sup> and WT mice (n = 4 per genotype), and processed for RT-PCR analysis using L-PGDS and GAPDH-specific primers. PCR products were resolved on a 2% agarose gel. **B)** Chondrocytes from WT or L-PGDS<sup>-/-</sup> mice were treated with 100 pg/mL IL-1α for the indicated time periods. Cell lysates were prepared and analyzed for L-PGDS and β-actin proteins by Western blotting. The blots are representative of results from three independent experiments. **C)** Conditioned media were collected and analyzed for prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) content by ELISA. Results are expressed as the mean ± SD of 3 independent experiments. \**P* < 0.05 compared with unstimulated cells.





**Supplemental Figure 2. Expression of C1, 2C, NITEG and VDIPEN in the knee joints of WT and L-PGDS<sup>-/-</sup> mice at 2 weeks post-DMM surgery.**

Knee joint sections from sham- (n = 6 per genotype) and DMM-operated (n = 6 per genotype) mice at 2 post-surgery were analyzed by immunohistochemistry for C1,2C, NITEG and VDIPEN. **B)** Percentage of positive stained area (C1,2C and VDIPEN), and positive chondrocytes (NITEG) in WT (open symbols) and L-PGDS<sup>-/-</sup> (filled symbols) mice. Data are presented as median with interquartile range. \*P<0.05 versus WT mice.



**Supplemental Figure 3. AAV2/5-mediated L-PGDS expression in the joint attenuated the severity of DMM-induced synovitis in L-PGDS  $-/-$  mice.** Ten-week-old L-PGDS  $-/-$  mice were intra-articularly injected with AAV2/5-GFP or AAV2/5-L-PGDS-GFP (n = 15 per group). Three days later, mice were subjected to sham (n = 6) or DMM (n = 9) surgery. Mice were sacrificed 4 weeks after DMM surgery, and the joints were harvested, and processed for hematoxylin and eosin staining. **(A)** Representative hematoxylin and eosin staining and **(B)** respective synovitis scores. Scale bars = 100  $\mu$ m. Data are presented as median with interquartile range. \*P<0.05 versus WT mice.

## CHAPITRE C :

### DISCUSSION

L'arthrose est une maladie dégénérative de l'articulation, caractérisée par un déséquilibre des processus physiologiques déclenchant un réseau de cascades inflammatoires et cataboliques. Bien que l'arthrose implique tous les tissus de l'articulation, le cartilage représente l'élément le plus important de cette physiopathologie en raison des dommages considérables et de la multitude de processus biochimiques activés au sein de ce tissu. Les médiateurs pro-inflammatoires en premier plan, notamment les cytokines, les prostaglandines et les ROS, jouent un rôle essentiel dans la pathogenèse de cette maladie (2, 4).

L'IL-1 $\beta$  est une cytokine essentielle à la réponse inflammatoire. C'est un inducteur majeur du catabolisme du cartilage dans l'arthrose. Cette cytokine pro-inflammatoire a la capacité de modifier le métabolisme des chondrocytes, affectant ainsi l'homéostasie de la matrice extracellulaire cartilagineuse (207). La dégradation de cette dernière est une caractéristique centrale de l'arthrose et est considérée comme étant médiée par les protéinases qui dégradent les composants structurels majeurs de la matrice, principalement le collagène de type II et l'aggrécane. La MMP-13 est la principale protéase responsable de la dégradation du collagène de type II, et les souris déficientes en MMP-13 sont protégées contre les dommages au cartilage de l'arthrose (161), tandis que les souris transgéniques développent des lésions spontanées du cartilage analogues à l'OA (404). L'autre enzyme clé, l'ADAMTS-5, est une protéinase dégradant l'aggrécane dans le cartilage murin, et les souris déficientes en ADAMTS-5 sont protégées contre l'arthrose induite chirurgicalement (174) et l'arthrite inflammatoire (176, 178).

La PGE<sub>2</sub> est un autre acteur important de la réponse inflammatoire. Elle est impliquée dans divers aspects de la pathogenèse de l'OA, notamment l'amplification de la réaction inflammatoire, la dégradation du cartilage et la douleur (350). La PGE<sub>2</sub> peut également contribuer à endommager le cartilage en inhibant la synthèse du collagène et des protéoglycanes (353). Des tissus articulaires arthritiques produisent de grandes quantités

de PGE<sub>2</sub> (352). Les chondrocytes en sont la principale source dans l'articulation. Des preuves directes ont été fournies concernant le rôle de la PGE<sub>2</sub> dans les maladies arthritiques, et en particulier dans l'arthrose (355). Une analyse d'expression génique du cartilage atteint (avec lésions) et du cartilage intact de patients souffrant d'arthrose a montré une expression accrue de la COX-2 et une production accrue de PGE<sub>2</sub> dans le cartilage atteint. D'autres études ont clairement mis en évidence une surexpression de COX-2 et de mPGES-1 dans le cartilage humain arthrosique (358, 350). Ces deux enzymes ont attirées beaucoup d'attention sur le rôle majeur qu'elles jouent dans l'inflammation et la douleur (355, 358). Des taux élevés de production de PGE<sub>2</sub> dans les tissus arthrosiques sont mesurés en réponse à la stimulation par l'IL-1 $\beta$  (355). Il a été démontré que d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-17 induisent la production de PGE<sub>2</sub> médiée par COX-2 et par mPGES-1 dans l'arthrose (282, 283). Ainsi, la modulation de la synthèse de PGE<sub>2</sub> chez les patients atteints d'arthrose peut représenter une cible majeure pour les stratégies thérapeutiques.

L'autre prostaglandine, PGD<sub>2</sub>, qui fait partie des prostaglandines les plus abondamment produites dans le liquide synovial (405), peut être libérée par plusieurs types de cellules présentes dans l'articulation, notamment les chondrocytes (406), les ostéoblastes (407), les fibroblastes synoviaux (408) et les mastocytes synoviaux (409), suggérant que la PGD<sub>2</sub> peut contribuer au maintien de l'homéostasie du cartilage. Il a été démontré que cette prostaglandine prévient l'apoptose des chondrocytes (410) et améliore la différenciation chondrogénique, ainsi que le dépôt de la matrice du cartilage hyalin (411). Il a également été rapporté que la PGD<sub>2</sub> stimule la synthèse du collagène (412), indiquant qu'elle pourrait protéger l'intégrité du cartilage non seulement en inhibant l'expression de MMP-1 et de MMP-13, mais également en renforçant les événements anaboliques des chondrocytes (413).

Des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire ont démontré que la L-PGDS est présente dans le cartilage humain et que son niveau d'expression est plus élevé dans le cartilage arthrosique que dans le cartilage sain (365). La cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  régule positivement, – alors que la PGD<sub>2</sub> régule négativement, – l'expression de la L-PGDS

dans des chondrocytes en culture. Ces résultats suggèrent que la L-PGDS pourrait être impliquée dans la pathogenèse de l'arthrose (365).

La PGD<sub>2</sub> induit ses effets en activant deux récepteurs membranaires, le récepteur D prostanöide 1 (DP1) (414) et une molécule de type récepteur chimioattractant localisée sur des cellules Th2 (CRTH2), également appelée DP2 (415). La surproduction de la PGD<sub>2</sub> contribue à de multiples processus pathologiques, notamment l'athérosclérose (416), la sclérose en plaques (417), le diabète (418), l'hypertension essentielle (419) et les maladies de Tay-Sachs et Sandhoff (420). Ainsi, l'expression de la L-PGDS est régulée positivement dans de nombreuses pathologies. Il a également été démontré que PGD<sub>2</sub> module l'inflammation, agissant comme médiateur pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, en fonction de l'état pathologique et du tissu touché. L'activation du récepteur DP1 est principalement associée aux effets anti-inflammatoires (421). En revanche, l'activation de DP2 est généralement associée à des effets pro-inflammatoires (422).

Dans notre projet, nous nous sommes intéressés aux mécanismes, ainsi que le rôle du récepteur de la prostaglandine D2 (DP1) et aussi de l'enzyme prostaglandine D synthase de type lipocaline (L-PGDS) dans la physiopathologie de l'arthrose.

Nous avons démontré pour la première fois que la délétion de la L-PGDS accélère et aggrave la progression de l'arthrose induite par la déstabilisation du ménisque médial (DMM) chez les souris. Nous avons démontré que comparées aux souris sauvages, des souris invalidées pour la L-PGDS (L-PGDS - / -) présentent une dégradation accrue du cartilage, une inflammation synoviale et une détérioration de l'os sous-chondral. Ces changements ont été associés à une expression amplifiée des enzymes MMP-13 et ADAMTS-5, qui dégradent la matrice du cartilage.

Après deux semaines, l'expression de la L-PGDS est augmentée dans le cartilage des souris WT opérées par DMM. Ces résultats sont en accord avec nos découvertes précédentes montrant des niveaux d'expression accrus de la L-PGDS dans le cartilage arthrosique humain (365), du cochon d'Inde et du chien (423). L'augmentation de l'expression de la L-PGDS dans le cartilage a également été rapportée dans l'arthrite murine induite par le collagène (424). L'expression accrue de la L-PGDS peut être la

conséquence d'un stress provoqué par une intervention chirurgicale, une surcharge mécanique et une production locale de médiateurs pro-inflammatoires. En effet, les cytokines pro-inflammatoires et l'impact mécanique induisent l'expression de la L-PGDS dans les explants cartilagineux et les chondrocytes en culture (365). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de l'expression de L-PGDS pourrait être impliquée dans la physiopathologie de l'arthrose.

Pour déterminer le rôle fonctionnel de la L-PGDS dans l'arthrose, nous avons étudié l'évolution de l'arthrose induite par la DMM chez les souris L-PGDS - / - et les souris WT. Nous avons démontré que l'étendue des lésions cartilagineuses observées chez les souris L-PGDS - / - était significativement accrue par rapport à celle des souris WT. De plus, deux semaines après l'intervention, l'augmentation des taux d'enzymes MMP-13 et ADAMTS-5 dans les articulations était significativement plus importante chez les souris L-PGDS - / -. Ces résultats ont été confirmés par des études *ex vivo* sur des explants de cartilage montrant une augmentation significative de la libération de protéoglycanes induite par l'IL-1 dans le cartilage provenant de souris L-PGDS - / - par rapport aux souris WT. Ensemble, ces données suggèrent que la suppression de la L-PGDS exacerbe les dommages du cartilage en augmentant l'expression de MMP-13 et ADAMTS-5. Ceci est également cohérent avec les résultats de nos travaux antérieurs montrant que PGD<sub>2</sub> et 15d-PGJ<sub>2</sub>, les principaux produits de L-PGDS, inhibent la production de MMP-1 et MMP-13 dans des chondrocytes en culture (386).

Nous avons également démontré que 8 semaines après induction de l'arthrose/déstabilisation du ménisque, les souris L-PGDS - / - présentaient une synovite plus développée que les souris WT. Ceci est probablement lié aux propriétés anti-inflammatoires de la L-PGDS et est en accord avec les études antérieures dans lesquelles l'injection de PGD<sub>2</sub> réduisait l'inflammation synoviale et les lésions articulaires dans l'arthrite induite par le collagène murin (424). Le 15d-PGJ<sub>2</sub>, un autre produit de la L-PGDS, permet également de réduire la synovite dans l'arthrite induite par le collagène chez la souris (425) et dans l'arthrite induite par un adjuvant chez le rat (426). D'autres études ont démontré que la PGD<sub>2</sub> atténue l'inflammation dans un certain nombre de modèles expérimentaux, notamment la dermatite atopique (427) et la colite (428). De plus, la

délétion de la L-PGDS exacerbe l'athérosclérose et la néphropathie (429). Enfin, la délétion de L-PGDS détériore, alors que sa surexpression améliore, la clairance bactérienne dans un modèle d'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* (430).

Les modifications de l'os sous-chondral sont une autre caractéristique essentielle de la pathogenèse de l'arthrose chez les patients qui en sont atteints et dans des modèles animaux d'arthrose. Une évaluation par micro-CT de l'os sous-chondral dans les articulations du genou des souris WT et L-PGDS - / - a révélé une sclérose de l'os sous-chondral, une augmentation de la BV/TV et du Tb Th, ainsi qu'une formation d'os extra-articulaire 8 semaines après l'intervention. Ces altérations étaient cependant plus prononcées chez les souris L-PGDS - / - que chez les souris WT. Ceci est probablement dû à l'importance de la PGD<sub>2</sub> dans le remodelage osseux (431). Ainsi, outre la dégénérescence du cartilage et la synovite, le déficit en L-PGDS augmente également l'amplitude des modifications au niveau de l'os sous-chondral. Le cartilage articulaire et l'os sous-jacent agissent comme une unité fonctionnelle de l'articulation. On pense que c'est deux compartiments jouent un rôle important dans l'apparition et la progression de l'arthrose. Étant donné que les souris utilisées dans notre étude sont des KO global et que la L-PGDS est exprimée à la fois dans le cartilage et l'os, nous ne pouvons pas déterminer si l'effet de la délétion de la L-PGDS est dû à une altération du cartilage ou de l'os, et leurs rôles hiérarchiques dans la sévérité de l'arthrose sont des domaines à approfondir.

Après avoir démontré que la délétion de la L-PGDS exacerbe les caractéristiques structurelles de l'arthrose, nous avons examiné l'effet de la surexpression de la L-PGDS dans l'articulation sur le développement de l'arthrose chez des souris L-PGDS - / -. Nous avons observé que l'administration intra-articulaire d'un vecteur AAV2/5 codant pour la L-PGDS réduit la sévérité de la dégradation du cartilage, l'expression de ADAMTS-5 et de MMP13 ainsi que la synovite, confirmant ainsi le rôle protecteur de la L-PGDS. Il est intéressant de noter que l'effet protecteur de la surexpression de L-PGDS est associé à une augmentation du taux de PGD<sub>2</sub>.

En plus de sa capacité à catalyser la production de PGD<sub>2</sub> et de 15d-PGJ<sub>2</sub>, la L-PGDS est également impliquée dans la liaison et le transport de petites molécules lipophiles

connues pour leur implication dans la physiopathologie de l'arthrose, telles que les rétinoïdes (432), les hormones thyroïdiennes (433) et les gangliosides (434). Par conséquent, il est possible que le manque de L-PGDS exacerbe l'arthrose en perturbant la disponibilité, le transport de ces molécules lipophiles ou en modifiant leurs voies de signalisation en aval.

L'une des limitations de notre étude est que, bien que nous ayons démontré que la délétion de la L-PGDS aggrave l'arthrose induite par l'instabilité, nous n'avons pas évalué l'effet de la délétion de la L-PGDS sur la progression de l'arthrose au cours du vieillissement, ce qui est également pertinent pour la pathogenèse de cette maladie. De plus, nous n'avons pas étudié l'effet de la délétion de L-PGDS sur la douleur, le principal symptôme de l'arthrose. Des études antérieures ont rapporté des effets antinociceptifs de la PGD<sub>2</sub>. Par exemple, Minami *et al.* ont démontré que le traitement par la PGD<sub>2</sub> prévient l'allodynie induite par la PGE<sub>2</sub> (435) et l'hyperalgésie évoquée par la nociceptine (436). L'effet antinociceptif de PGD<sub>2</sub> est corroboré par la découverte de Telleria-Diaz (437) qui montre que l'application topique de PGD<sub>2</sub> sur la moelle épinière de rats dont l'articulation du genou était enflammée diminuait la réponse à la stimulation mécanique. Cependant, d'autres études ont rapporté des effets pronociceptifs de la PGD<sub>2</sub>. Par exemple, l'allodynie induite par la PGE<sub>2</sub> est atténuée chez les souris L-PGDS - / - (438), tandis que la PGD<sub>2</sub> induit une hyperalgésie et une allodynie (439). Des études complémentaires sont nécessaires pour définir le rôle exact de la PGD<sub>2</sub> et de la L-PGDS dans la douleur liée à l'arthrose.

Toujours dans l'objectif de mieux déterminer l'effet de la L-PGDS dans l'arthrose, nous avons évalué l'effet de son métabolite la PGD<sub>2</sub>. Dans des travaux antérieurs, il a été démontré que la PGD<sub>2</sub> inhibe l'expression de la MMP-1 et de la MMP-13 induite par l'IL-1 dans les chondrocytes humains (385). Nous apportons également la preuve que l'effet inhibiteur de la PGD<sub>2</sub> est véhiculé par le récepteur DP1 via la voie de signalisation AMPc/PKA. Ainsi, la PGD<sub>2</sub> a le potentiel de prévenir les dommages au cartilage en bloquant l'expression de MMP-1 et MMP-13 (386). De plus, le traitement par la PGD<sub>2</sub> augmente les taux intracellulaires d'AMPc et de calcium confirmant la présence fonctionnelle de DP1 en chondrocytes. Ensuite, l'effet d'agonistes spécifiques de DP1 et



CRTH2 sur l'expression de MMP-1 et MMP-13, induite par l'IL-1 a été étudié. Il a été montré que l'agoniste de DP1, BW245C - mais pas l'agoniste de CRTH2, DK-PGD<sub>2</sub>-, réduit les expressions de MMP-1 et MMP-13, induites par l'IL-1 (386). Conformément à cette découverte, un traitement avec un anticorps polyclonal dirigé contre DP1 a bloqué l'effet inhibiteur de la PGD<sub>2</sub> sur l'expression de la MMP-1 et de la MMP-13, induite par l'IL-1. Pris ensemble, ces résultats déterminent que la PGD<sub>2</sub> régule à la baisse l'expression de la MMP1 et de la MMP-13 induite par l'IL-1, à la suite de l'activation du récepteur DP1. Bien que l'effet inhibiteur de BW245C ait été aussi puissant que celui de PGD<sub>2</sub>, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que PGD<sub>2</sub> régule à la baisse l'expression de MMP-1 et de MMP-13 induite par IL-1 par le biais d'un mécanisme indépendant de DP1. En effet, la PGD<sub>2</sub> peut être convertie de manière non enzymatique en 15-désoxy- $\Delta$ -12,14-PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) (386), dont l'effet inhibiteur de l'induction de l'expression de MMP-1 et de MMP-13 a été démontré dans plusieurs types de cellules, notamment les chondrocytes (386). D'autres études seront nécessaires pour définir si des mécanismes indépendants de DP1 sont impliqués dans l'effet inhibiteur de la PGD<sub>2</sub> sur l'expression de MMP-1 et MMP-13 induite par l'IL-1 dans les chondrocytes.

En général, l'occupation de DP1 active l'adénylate cyclase et augmente les taux intracellulaires d'AMPc, menant à l'activation de la PKA (365). Nos résultats suggèrent que les mécanismes intracellulaires qui transmettent l'effet inhibiteur de la PGD<sub>2</sub> sur l'expression de MMP-1 et MMP-13 induite par IL-1, impliquent la voie AMPc/PKA. Ceci est confirmé par le fait que la stimulation des chondrocytes par la PGD<sub>2</sub> augmente les taux intracellulaires d'AMPc. De plus, les agents éleveurs de l'AMPc inhibent l'expression de MMP-1 et de MMP-13 induite par IL-1. Enfin, l'effet inhibiteur de la PGD<sub>2</sub> a été bloqué par les inhibiteurs de la PKA (H89 ou KT5720). Ces données ont ainsi identifié la voie de signalisation DP1/AMPc/PKA comme étant le mécanisme intracellulaire par lequel le PGD<sub>2</sub> empêche la production de MMP-1 et MMP-13 dans les chondrocytes stimulées par l'IL-1(386).

Pour étudier l'effet de la PGD<sub>2</sub> sur son récepteur DP1 ainsi que son rôle dans la progression de la maladie, nous avons démontré que les souris déficientes en DP1 présentent une dégradation étendue du cartilage dans les deux modèles d'arthrose utilisés

– avec l’âge ou après une déstabilisation du ménisque. L’examen histologique a révélé que les dommages structuraux du cartilage sont relativement plus graves chez les souris DP1 - / - que chez les souris WT dans les deux modèles d’arthrose. Pour déterminer le mécanisme sous-jacent à l’effet du déficit en DP1 sur la dégradation du cartilage, nous avons analysé les taux d’ADAMTS-5 et de MMP-13. Les résultats ont montré qu’il y a peu ou pas d’expression de MMP-13 ou d’ADAMTS-5 dans les articulations du genou des souris DP1 - / - et WT à l’âge de 3 mois. À l’âge de 9 mois, les niveaux d’expression d’ADAMTS-5 et de MMP-13 étaient presque indétectables chez les souris WT, mais les deux étaient significativement plus élevés dans les articulations du genou des souris DP1 - / -. Dans le modèle DMM, les niveaux d’expression de MMP-13 et ADAMTS-5 étaient plus élevés dans le cartilage articulaire chez les souris DP1 - / - que chez les souris témoin WT.

Des études *ex vivo* avec des explants de cartilage ont révélé que le taux de dégradation des protéoglycanes à la suite de la stimulation par l’IL-1 $\alpha$  est plus élevé dans le cartilage des souris DP1 - / - que chez les souris WT, suggérant que la délétion de DP1 augmente la synthèse des enzymes dégradant le cartilage. Ceci est cohérent avec nos découvertes précédentes montrant que l’activation de DP1 empêche l’expression de MMP-13 et de MMP-1 dans des chondrocytes en culture (386). Prises ensemble, ces données suggèrent fortement que la délétion de DP1 induit la régulation à la hausse des MMP et éventuellement d’autres enzymes cataboliques qui exacerbent la dégradation du cartilage.

Outre la destruction du cartilage, l’arthrose chez l’homme et dans des modèles expérimentaux est caractérisée par des modifications de l’os sous-chondral (3, 14). L’analyse par micro-CT a révélé une sclérose osseuse sous-chondral étendue, une augmentation de la BV/TV et de la TbTh, ainsi qu’une diminution de la TbSp dans les articulations de souris DP1 - / - âgées de 15 mois par rapport aux articulations de souris WT du même âge. Nous avons également noté que des ostéophytes importants s’étaient développés dans les articulations du genou des souris DP1 - / - à l’âge de 15 mois. Ces paramètres ont également augmenté 8 semaines après chirurgie par DMM chez les deux génotypes. De manière intéressante, dans le modèle DMM, l’ampleur des modifications osseuses est également plus prononcée chez les souris DP1 - / -. Ainsi, le déficit en DP1

accélère non seulement la dégradation du cartilage, mais aggrave également les modifications de l'os sous-chondral.

Après avoir démontré que la délétion de DP1 aggrave les modifications analogues à celles de l'arthrose, nous avons vérifié si l'administration de l'agoniste sélectif de DP1, BW245C, pouvait modifier le développement de l'arthrose chez les souris WT. Nous avons démontré que son administration réduisait les modifications de type OA induites par la DMM dans le cartilage et les os. De manière intéressante, BW245C a perdu son effet bénéfique chez les souris DP1 - / - (données non présentées), ce qui exclut la possibilité qu'une réactivité croisée avec des voies distinctes puisse être responsable de l'effet observé de BW245C.

Bien que nos données démontrent clairement un rôle central pour DP1 dans la pathogenèse de l'arthrose, il n'est pas clair si l'exacerbation de l'arthrose en l'absence de DP1 provient d'altérations du métabolisme des os ou du cartilage. Des analyses utilisant des souris déficientes en DP1 spécifique du cartilage et des os pourraient déterminer le rôle de DP1 dans chaque tissu au cours de la progression de l'arthrose.

En plus de l'augmentation de l'expression de MMP-13 et d'ADAMTS-5, la délétion de DP1 peut exacerber l'arthrose via une augmentation de l'inflammation. En effet, plusieurs études ont montré que le déficit en DP1 amplifie – alors que l'activation de DP1 atténue – l'inflammation dans un certain nombre de modèles. Par exemple, il a été démontré que le déficit en DP1 exacerbe l'inflammation cutanée dans un modèle d'hypersensibilité de contact avec l'allergène, ce qui s'accompagne d'une production élevée d'interféron  $\gamma$  et d'IL-17 (440). De plus, les souris chimériques présentant un déficit sélectif en DP1 hématopoïétique présentent une inflammation accrue dans les voies respiratoires, et l'administration d'un agoniste sélectif de DP1 supprime de façon substantielle les réactions inflammatoires de manière dépendante de l'IL-10 (441). Il a également été démontré que le déficit en DP1 aggrave l'inflammation des poumons chez les souris atteintes d'une lésion pulmonaire aiguë provoquée par la bléomycine, ce qui est associé à une production accrue de facteur 1, inhibiteur de la leucémie, d'ostéopontine et de chimiokine (motif C-X-C) (442).

Dans une autre étude, le traitement des souris présentant une délétion en DP1 avec son agoniste s'est révélé protecteur, en diminuant les réponses inflammatoires et la fibrose (443). De plus, l'activation de DP1 empêche les lésions cutanées dans un modèle murin de dermatite atopique, agissant probablement en réduisant le recrutement de cellules inflammatoires dans le derme et en augmentant la production de la cytokine immunorégulatrice IL-10 (444). Enfin, il a été démontré que BW245C prévient la progression de l'arthrite induite par le collagène chez la souris, en supprimant la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires IL-1, IL-6, IL-17 et PGE<sub>2</sub> (445). Il est donc possible qu'une production accrue de médiateurs pro-inflammatoires puisse également contribuer à l'exacerbation de l'arthrose observée chez les souris DP1 - / -.

Un mécanisme supplémentaire par lequel la délétion de DP1 peut exacerber l'arthrose est l'amélioration de l'angiogenèse, caractéristique de l'arthrose (446). En effet, il a été démontré que le déficit en DP1 potentialise et que BW245C inhibe l'angiogenèse et l'hyperperméabilité vasculaire (45). Ainsi, l'arthrose aggravée observée chez les souris DP1 - / - peut être attribuée, au moins partiellement, à une angiogenèse accrue.

Les mécanismes précis par lesquels la délétion de DP1 exacerbe l'OA sont probablement multiples, mais pourraient impliquer une régulation à la baisse et une altération de la voie AMPc/PKA. De plus, plusieurs études ont montré que l'activation de la voie AMPc/PKA dans les chondrocytes empêche l'expression de divers médiateurs inflammatoires et cataboliques tels que l'oxyde nitrique, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et les MMP (447, 448). Par conséquent, il est possible que la régulation négative de la voie AMPc/PKA induise, au moins partiellement, l'effet exacerbant de la délétion de DP1 sur la progression de l'arthrose.

La délétion de DP1 pourrait être compensée par DP2, l'autre récepteur du PGD<sub>2</sub>. Cela est cependant peu probable, car les deux récepteurs transmettent généralement des signaux antagonistes (440). Par ailleurs, nous avons précédemment signalé que les agonistes de DP2 n'ont aucun effet sur la production de MMP-1 et de MMP-13 dans des chondrocytes en culture (386). De plus, et contrairement aux résultats chez les souris WT,

le traitement des souris DP1 - / - avec BW245C n'a pas d'effet sur la progression de l'arthrose induite par DMM.

### **Rôle des produits dérivés de PGJ<sub>2</sub> dans la guérison de l'arthrose**

Il est connu que la PGD<sub>2</sub> est instable dans les tissus et subit deux étapes de déshydratation spontanée pour générer la 15d-PGJ<sub>2</sub>. La 15d-PGJ<sub>2</sub> est une prostaglandine importante dans la résolution de l'inflammation (449). Ceci est également vrai pour les chondrocytes de patients souffrant d'arthrose (450, 451). Par conséquent, l'interrupteur dans la synthèse des prostaglandines semble être un facteur majeur pour arrêter l'inflammation et amorcer la guérison du cartilage de l'arthrose. En effet, il existe de nombreuses autres réactions impliquant la COX-2, à la fois pendant les phases inflammatoire et anti-inflammatoire de l'arthrite et d'autres maladies inflammatoires (452).

Il existe un autre produit dérivé de PGJ<sub>2</sub>, appelé  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub>, qui peut être important pour la guérison. Cependant, il y a beaucoup moins de preuves à cet égard par rapport à 15d-PGJ<sub>2</sub>. Comme cette dernière,  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub> a deux atomes de carbone réactifs électrophiles, par opposition à un seul dans le composé parent PGJ<sub>2</sub>. Chez des singes, une injection de dose unique (1 mg/kg) du précurseur PGD<sub>2</sub> a entraîné une augmentation de 20 à 180 fois du débit urinaire de  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub>. Cette augmentation était réduite de 50 % si les singes étaient traités avec l'indométacine, un inhibiteur non sélectif des COX. Ainsi,  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub> semble être un métabolite naturel de la PGD<sub>2</sub> (454). Bien que ce métabolite ait été étudié pour ses effets cytotoxiques, une seule étude publiée suggère que la  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub> participe au processus de réparation du cartilage et de l'os arthrosiques.

Siddhivarn *et al.* ont réalisé des étirements mécaniques sur des lignées cellulaires ostéoblastiques avec une évaluation des paramètres biochimiques et cellulaires. Il a été trouvé qu'un allongement de 1 % pendant 24 heures est optimal pour maximiser la formation de nodules osseux avec un maintien de la viabilité cellulaire supérieur à 90 % (455). Tout d'abord, cet étirement mécanique induit la formation de nodules, alors qu'aucun n'a été observé chez des témoins non étirés. Plus curieusement, les étirements stimulent la synthèse de la COX-1 et de la COX-2, la COX-1 augmentant d'environ 50 % 4 heures après l'étirement, mais la COX-2 augmentant de 400 % à 700 %, respectivement

5 et 24 heures après l'étirement. PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub>, ainsi que le dérivé de PGD<sub>2</sub>, Δ12-PGJ<sub>2</sub>, n'ont pas été détectés dans les cellules non étirées, mais étaient abondants dans les cellules étirées. De même, l'étirement induit la synthèse de la PGD synthase, qui catalyse le passage de réactions inflammatoires à des réactions de guérison. De manière remarquable, aucune 15d-PGJ<sub>2</sub> n'a été trouvée après l'induction de cette réponse cicatrisante/nodulaire (453). En outre, de nombreuses preuves suggèrent que la réponse de guérison dans le cartilage OA est en partie transmise par 15d-PGJ<sub>2</sub>, guérison induite par la liaison et l'activation du récepteur nucléaire PPAR. Après interaction avec 15d-PGJ<sub>2</sub>, PPAR $\gamma$  migre vers le noyau et active la transcription de diverses molécules effectrices pour la résolution de l'inflammation. De manière remarquable, l'étirement dans ces expériences a également stimulé la transcription du gène PPAR $\gamma$ -1, même si son ligand habituel (15d-PGJ<sub>2</sub>) n'était pas disponible (453). Cela laisse supposer que la Δ12-PGJ<sub>2</sub> pourrait être un facteur important pour enrayer l'inflammation et favoriser la guérison des os et éventuellement du cartilage. Cette hypothèse reste à prouver.

Pourquoi cette contribution hypothétique de Δ12-PGJ<sub>2</sub> dans la guérison de l'arthrose est-elle intrigante ? Bien que l'on ait d'abord pensé que la conversion de PGD<sub>2</sub> en 15d-PGJ<sub>2</sub> ou Δ12-PGJ<sub>2</sub> dépendait de la présence d'albumine sérique, il a été découvert par la suite que la 15d-PGJ<sub>2</sub>, bien étudiée, était dérivée de PGD<sub>2</sub> indépendamment de l'albumine (456). Cependant, la synthèse de l'autre métabolite de la PGD<sub>2</sub>, Δ12-PGJ<sub>2</sub>, dépend de l'interaction avec l'albumine. Par coïncidence, l'un des traitements les plus prometteurs contre l'arthrose est dérivé de la fraction de faible poids moléculaire de l'albumine sérique humaine disponible dans le commerce (457).

### **Importance des dérivées de prostaglandines dans la guérison OA**

Il existe de nombreuses preuves que la transition de mPGES-1 à PGD synthase, avec la synthèse ultérieure de PGJ<sub>2</sub> dérivée de prostaglandines, est essentielle pour initier des voies biochimiques associés à la guérison de l'arthrose (Figure 12). Comme mentionné ci-dessus, PPAR $\gamma$ -1 et -2 font partie d'une superfamille nucléaire d'hormones. Ils dérivent du même gène et produisent des protéines légèrement différentes par l'épissage alternatif de pré-ARNm avec PPAR $\gamma$ -2 ayant 30 résidus d'acides aminés supplémentaires à son

extrémité amino-terminale. Il s'agit du gène PPAR $\gamma$ -1 (régulé positivement par l'étirement des ostéoblastes) qui est abondant dans de nombreux tissus et cellules immunitaires. PPAR $\gamma$ -1 est exprimé dans le cartilage humain mais régulé négativement dans l'arthrose. Dans les chondrocytes articulaires, le gène est également régulé à la baisse par IL-1 $\beta$  (458). 15d-PGJ $_2$  a été le premier agoniste endogène de PPAR à identifier (459, 460). De même, la 15d-PGJ $_2$  a complètement supprimé la production de NO et de PGE $_2$  dans les chondrocytes arthrosiques humaine (461). La COX-2 était légèrement inhibée, mais il restait une activité substantielle de la COX-2 permettant la synthèse de PGD $_2$  au cours de cette phase anti-inflammatoire (450,457). Enfin, 15d-PGJ $_2$  inhibe complètement mPGES-1 dans les chondrocytes arthrosiques humaine et de rat, supprimant ainsi la synthèse de PGE $_2$  (462, 463).

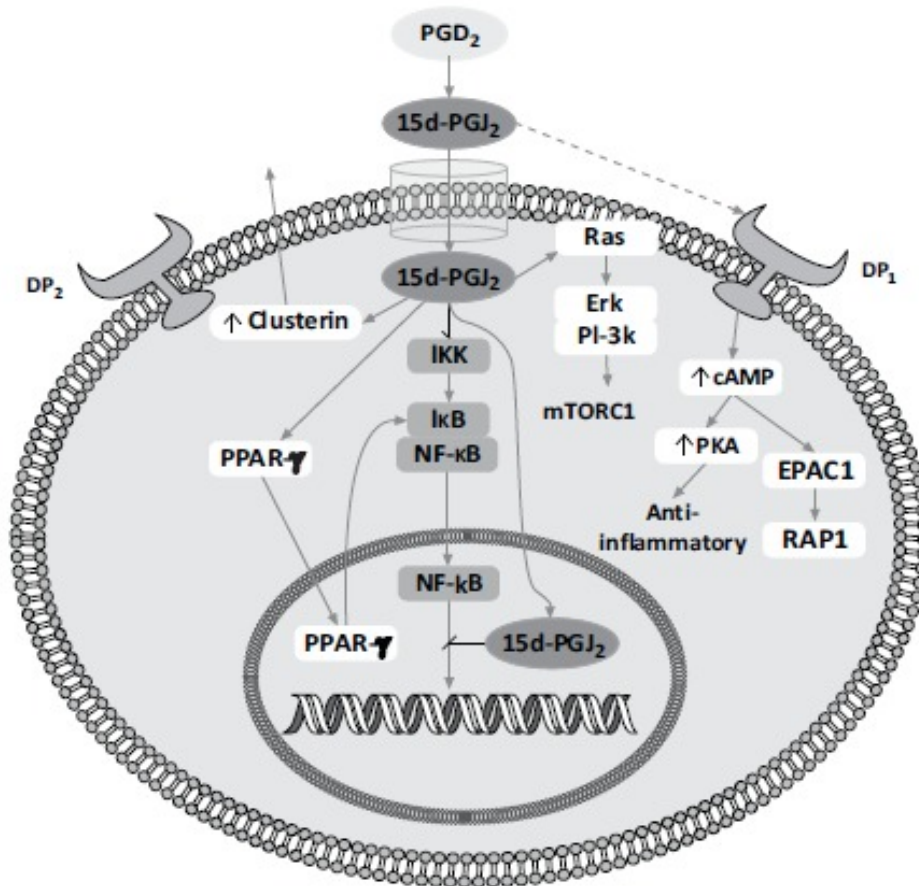


Figure 12: Représentation schématique de l'effet de 15d-PGJ $_2$ .

15d-PGJ<sub>2</sub> a un certain nombre de voies par lesquelles il initie une cascade anti-inflammatoire. Il peut réagir avec les PGD<sub>2</sub> récepteurs (DP 1 et DP 2) pour stimuler la production d'AMP cyclique (AMPC) et augmenter la protéine kinase A (PKA) en aval conduisant à des effets anti-inflammatoires. Plus important encore, 15d-PGJ<sub>2</sub> peut entrer dans la cellule directement et activer PPAR résultant dans la transcription de plusieurs ARNm anti-inflammatoires. De plus, PPAR $\gamma$  inhibe le facteur de transcription NF- $\kappa$ B en se liant à l'inhibiteur I $\kappa$ B, protégeant ainsi la dégradation de I $\kappa$ B par la kinase I $\kappa$ B (IKK). Enfin, 15d-PGJ<sub>2</sub> peut également inhiber l'activité IKK par le biais d'une éventuelle modification covalente et, plus loin en aval, peut inhiber la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et altérer la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN (Article de référence :453).

Le 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibe également la matrice du cartilage dégradant et MMPs agréganases. Ceci est accompli via la suppression du système d'activation de la transcription NF- $\kappa$ B (Figure 12). Cette délétion implique un certain nombre de mécanismes, notamment l'inhibition directe de la kinase I $\kappa$ B, qui libère le NF- $\kappa$ B permettant la translocation nucléaire (464). Les autres étapes de la voie d'activation de la transcription NF- $\kappa$ B sont inhibées par 15d-PGJ<sub>2</sub> mais sont indépendantes de PPAR $\gamma$  (465). Par conséquent, il est important de noter que l'arrêt de ce système entraîne les effets anti-inflammatoires de l'inhibition de la synthèse de MMP et d'aggréganase. Comme la COX-2 est régulée par NF- $\kappa$ B et est également nécessaire pour la synthèse de PGJ<sub>2</sub>, il se peut que plusieurs niveaux de contrôle de NF- $\kappa$ B soient nécessaires pour affecter le commutateur mPGES en PGD synthase. D'autres propriétés anti-inflammatoires de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, telles que l'inhibition de la MMP 13 induite par le traitement au TNF $\alpha$ , sont observées non seulement dans les chondrocytes mais également dans les fibroblastes synoviaux humains. Ceci est également induit par l'inhibition du système NF- $\kappa$ B (466).

Pour résumer, on s'attend à ce que 15d-PGJ<sub>2</sub>, et peut-être le  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub>, puissent avoir des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* (figure 12). L'induction de ces deux prostaglandines pourrait faire partie du mécanisme d'action requis pour un nouveau traitement de l'arthrose du genou. En ce qui concerne la stabilité et l'administration directe de ces deux prostaglandines, des effets anti-inflammatoires ont été observés chez un



modèle murin d'inflammation, mais uniquement si 15d-PGJ<sub>2</sub> était encapsulée dans des nanoparticules (467).

## CONCLUSION

En conclusion, nos résultats démontrent, pour la première fois, que l'enzyme L-PGDS ainsi que le récepteur de la prostaglandine D2 (DP1) contribuent à l'atténuation de la dégradation du cartilage et aux changements osseux de l'os sous-chondral associés à l'arthrose. Lors de la première étude, nous avons montré que les souris déficientes en L-PGDS présentent une grande dégradation du cartilage et une sclérose au niveau de l'os sous-chondral par rapport aux souris sauvages WT. Dans la seconde partie de notre projet, nous avons démontré que le récepteur DP1 contribue au même effet que la L-PGDS.

Ces résultats fournissent, à notre connaissance, la première preuve que la voie de L-PGDS/PGD<sub>2</sub>/DP1 soutient d'autres voies anti-inflammatoires et anaboliques pour compenser les dégradations et la progression de la maladie. Nos résultats suggèrent que cette voie pourrait constituer une cible potentielle pour une intervention pharmacologique dans le traitement de l'arthrose et éventuellement d'autres maladies arthritiques. Cependant, de nombreuses questions demeurent quant à l'implication de la PGD<sub>2</sub> et de la L-PGDS dans les mécanismes moléculaires précis de la régulation des voies et des gènes anti-inflammatoires.

Pour compléter ce travail, des études complémentaires sont nécessaires pour étudier l'implication de cette voie dans les différents tissus de l'articulation (cartilage, os sous-chondral,...). Ensuite caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de la DP1 et de la L-PGDS dans les chondrocytes humaines. En vérifiant les effets des cytokines pro-inflammatoires et les modifications épigénétiques sur l'expression des deux gènes. Afin de mieux comprendre leurs rôles dans le processus physiopathologique de l'arthrose, les chondrocytes seront traités avec des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-17) et l'expression de la protéine DP1 et L-PGDS et son ARNm seront évaluées par immunoblot et RT-PCR en temps réel, respectivement. L'activité des promoteurs de DP-1 et L-PGDS (déjà clonés dans le laboratoire) sera analysée dans des expériences de transfection transitoire. Le rôle de l'acétylation des histones sera évalué en examinant l'effet des inhibiteurs des HDAC (TSA, VA, etc) sur

l'expression des deux gènes et en analysant l'état d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur de DP1 et la L-PGDS.

## BIBIOGRAPHIE

- 1- Blanco, F. J., Rego, I. & Ruiz- Romero, C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011;7, 161–169.
- 2- Johanne Martel-Pelletier, PhD, Jean-Pierre Pelletier, MD. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Joint Diseases and Related Surgery*, 2010;21(1):2-14.
- 3- Burger H, van Daele PL, Odding E, Valkenburg HA, Hofman A, Grobbee DE, et al. Association of radiographically evident osteoarthritis with higher bone mineral density and increased bone loss with age. The Rotterdam Study. *Arthritis Rheum* 1996;39:81-6.
- 4- David J Hunter, David T Felson. Osteoarthritis. *BMJ* 2006;332;639-642.
- 5- Bombardier C, Hawker G, Mosher D. The Impact of Arthritis in Canada: Today and Over the Next 30 Years. *Arthritis Alliance of Canada*. 2012.
- 6- Storheim K, Zwart JA. Musculoskeletal disorders and the Global Burden of Disease study. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(6):949-950.
- 7- Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 2003; 81(9):646-656.
- 8- Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(7):437-441.
- 9- Arden, N. & Cooper, C. in *Osteoarthritis Handbook* (eds Arden, N.& Cooper, C.) 1–22 (Taylor and Francis, 2006).
- 10- Felson, D. T. in *Osteoarthritis* (eds Brandt, K. D., Doherty, M. & Lohmander, L. S.) 9–16 (Oxford Univ. Press, 2003).
- 11- Felson, D. T. et al. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 1987; 30, 914–918.
- 12- van Saase, J. L., van Romunde, L. K., Cats, A., Vandenbroucke, J. P. & Valkenburg, H. A. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann. Rheum. Dis.* 1989;48, 271–280.
- 13- Johnson, V. L. & Hunter, D. J. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2014;28, 5–15.
- 14- Bronner F. and Farach-Carson M.C. Bone and Osteoarthritis. *British library cataloguing in publication data, topics in bone biology*, 2007. 4.
- 15- Garriga X.M. Definition, etiology, classification, and presentation forms. *Aten Primaria*, 2014. 46(1): 3-10.
- 16- Hunter DJ1, McDougall JJ, Keefe FJ. The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2008; 34(3): 623-43.

- 17- Peat G, McCarney R, Croft P. Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care. *Ann Rheum Dis* 2001;60: 91–7.
- 18- Hannan MT, Anderson JJ, Zhang Y, Levy D, Felson DT. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women. The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1993;36:1671-80.
- 19- Sowers M, Lachance L, Jamadar D, Hochberg MC, Hollis B, Crutchfield M, et al. The associations of bone mineral density and bone turnover markers with osteoarthritis of the hand and knee in pre- and perimenopausal women. *Arthritis Rheum* 1999;42:483-9.
- 20- Anderson SA, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rh.* 2010; 24(1):15-26.
- 21- Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br Med Bull.* 2013;105:185-199.
- 22- Ding C, Jones G, Wluka AE, Cicuttini F. What can we learn about osteoarthritis by studying a healthy person against a person with early onset of disease? *Curr Opin Rheum.* 2010;22(5):520-527.
- 23- Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander S. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthr Cartilage.* 1995;3(4):261-267.
- 24- Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnič M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, Van Dijk CN. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012; 20(3):423-435.
- 25- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(6):1697-1707.
- 26- Mobasher A., Matta C., Zákány R., Musumeci G. Chondrosenescence: Definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas.* 2015;80:237–244.
- 27- Hayflick L. Intracellular determinants of cell aging. *Mech. Ageing Dev.* 1984;28:177–185.
- 28- Musumeci G., Szychlinska M.A., Mobasher A. Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: Molecular markers of senescent chondrocytes. *Histol. Histopathol.* 2015;30:1–12.
- 29- Mobasher A. Applications of proteomics to osteoarthritis, a musculoskeletal disease characterized by aging. *Front. Physiol.* 2011;2.
- 30- Ryder J.J., Garrison K., Song F., Hooper L., Skinner J., Loke Y., Loughlin J., Higgins J.P., MacGregor A.J. Genetic associations in peripheral joint osteoarthritis and spinal degenerative disease: A systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67:584–591.
- 31- Reynard L.N., Loughlin J. Genetics and epigenetics of osteoarthritis. *Maturitas.* 2012;71:200–204.

- 32- Khan I.M., Redman S.N., Williams R., Dowthwaite G.P., Oldfield S.F., Archer C.W. The development of synovial joints. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2007;79:1–36.
- 33- Felson D.T., Lawrence R.C., Dieppe P.A., Hirsch R., Helmick C.G., Jordan J.M., Kington R.S., Lane N.E., Nevitt M.C., Zhang Y., et al. Osteoarthritis: New insights. Part 1: The disease and its risk factors. *Ann. Intern. Med.* 2000;133:635–646.
- 34- Styrkarsdottir U., Thorleifsson G., Helgadóttir H.T., Bomer N., Metrustry S., Bierma-Zeinstra S., Strijbosch A.M., Evangelou E., Hart D., Beekman M., et al. Severe osteoarthritis of the hand associates with common variants within the ALDH1A2 gene and with rare variants at 1p31. *Nat. Genet.* 2014;46:498–502.
- 35- Bui C., Barter M.J., Scott J.L., Xu Y., Galler M., Reynard L.N., Rowan A.D., Young D.A. cAMP response element-binding (CREB) recruitment following a specific CpG demethylation leads to the elevated expression of the matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes and osteoarthritis. *FASEB J.* 2012;26:3000–3011.
- 36- Hashimoto K., Otero M., Imagawa K., de Andrés M.C., Coico J.M., Roach H.I., Oreffo R.O., Marcu K.B., Goldring M.B. Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1 $\beta$  (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG Sites. *J. Biol. Chem.* 2013;288:10061–10072.
- 37- Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman B, Aliabadi P, Levy D. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(4):728-733.
- 38- Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage.* 2005;13(9):769-81.
- 39- Maleki-Fischbach M, Jordan JM. Sex differences in magnetic resonance imaging-based biomarkers and in those of joint metabolism. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):1-8.
- 40- Keefe FJ, Lefebvre JC, Egert JR, Affleck G, Sullivan MJ, Caldwell DS. The relationship of gender to pain, pain behavior, and disability in osteoarthritis patients: the role of catastrophizing. *Pain,* 2000; 87(3):325-334.
- 41- Perrot S, Poiraudéau S, Kabir-Ahmadi M, Rannou F. Correlates of pain intensity in men and women with hip and knee osteoarthritis. Results of a national survey: The French ARTHRIX study. *Clin J Pain.* 2009; 25(9): 767-772.
- 42- Sims EL, Carland JM, Keefe FJ, Kraus VB, Guilak F, Schmitt, D. Sex differences in biomechanics associated with knee osteoarthritis. *J Women Aging.* 2009; 21(3):159-170.
- 43- Elbaz A, Debbi EM, Segal G, Haim A, Halperin N, Agar G, Mor A, Debi R. Sex and Body Mass Index Correlate With Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index and Quality of Life Scores in Knee Osteoarthritis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2011; 92(10):1618-1623.

- 44- Tonelli SM, Rakel BM, Cooper NA, Angstrom WL, Sluka KA. Women with knee osteoarthritis have more pain and poorer function than men, but similar physical activity prior to total knee replacement. *Biol Sex Differ.* 2:12.
- 45- Glass N, Segal NA, Sluka KA, Torner JC, Nevitt MC, Felson DT, Bradley LA, Neogi T, Lewis CE, Frey-Law LA. Examining sex differences in knee pain: the Multicenter Osteoarthritis Study. *Osteoarthr Cartilage.* 2014;22(8):1100 -1106.
- 46- Reginster JY, Kvasz A, Bruyère O, Henrotin Y. Is there any rationale for prescribing hormone replacement therapy (HRT) to prevent or to treat osteoarthritis? *Osteoarthr Cartilage.* 2003, 11(2):87-91.
- 47- Tanko LB, Søndergaard BC, Oestergaard S, Karsdal MA, Christiansen C. An update review of cellular mechanisms conferring the indirect and direct effects of estrogen on articular cartilage. *Climacteric.* 2008;11(1):4-16.
- 48- Otterness IG, Eckstein F. Women have thinner cartilage and smaller joint surfaces than men after adjustment for body height and weight. *Osteoarthr Cartilage.* 2007;15(6):666-72,.
- 49- Jones G, Glisson M, Hynes K, Cicuttini F. Sex and site differences in cartilage development: a possible explanation for variations in knee osteoarthritis in later life. *Arthritis Rheum.* 2000;43(11):2543-2549.
- 50- Cooper C, Snow S, McAlindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D, Dieppe PA. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):995–1000.
- 51- Hunter DJ. Focusing osteoarthritis management on modifiable risk factors and future therapeutic prospects. *Ther Adv Musculoskel Dis.* 2009;1(1):35-47,
- 52- Goulston LM, Kiran A, Javaid MK, Soni A, White KM, Hart DJ, Spector TD, Arden NK. Does obesity predict knee pain over fourteen years in women, independently of radiographic changes? *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011; 3(10):1398-1406.
- 53- Lee J, Song J, Hootman JM, Semanik PA, Chang RW, Sharma L, van Horn L, Bathon JM, Eaton CB, Hochberg MC, Jackson R, Kwoh CK, Mysiw WJ, Nevitt M, Dunlop DD. Obesity and Other Modifiable Factors for Physical Inactivity Measured by Accelerometer in Adults With Knee Osteoarthritis. *Arthrit Care Res.* 2013b; 65(1):53-61.
- 54- Riddle DL, Stratford PW. Body Weight Changes and Corresponding Changes in Pain and Function in Persons with Symptomatic Knee Osteoarthritis: A Cohort Study. *Arthrit Care Res.* 2013; 65(1):15-22.
- 55- Messier SP, Ettinger WH, Doyle TE, Morgan T, James MK, O'Toole ML, Burns R. Obesity: Effects on Gait in an Osteoarthritic Population. *J Appl Biom.* 1996;12(2):161-172.
- 56- Griffin TM, Huebner JL, Kraus VB, Guilak F. Extreme obesity due to impaired leptin signaling in mice does not cause knee osteoarthritis. *Arthrit Rheum.* 2009; 60(10):2935-2944.

- 57- Guilak F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Cl Rh.* 2011;25(6):815-823.
- 58- Runhaar J, Koes BW, Clockaerts S, Bierma-Zeinstra SMA. A systematic review on changed biomechanics of lower extremities in obese individuals: a possible role in development of osteoarthritis. *Obesity Rev.* 2011;12(12):1071-1082.
- 59- Katz JD, Agrawal S, Velasquez, M. Getting to the heart of the matter: osteoarthritis takes its place as part of the metabolic syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22(5):512-519.
- 60- Issa RI, Griffin TM. Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiol Aging Age Relat Dis.* 2012; 9(2):pii:17470.
- 61- Hart DJ, Doyle DV, Spector TD. Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J Rheumatol.* 1995; 22(6):1118-1123.
- 62- Sowers M, Karvonen-Gutierrez CA, Palmieri-Smith R, Jacobson JA, Jiang Y, Ashton-Miller JA. Knee osteoarthritis in obese women with cardiometabolic clustering. *Arthritis Care Res.* 2009; 61(10):1328-1336.
- 63- Anderson J.J., Felson D.T. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am. J. Epidemiol.* 1988;128:179–189.
- 64- Jordan J.M., Linder G.F., Renner J.B., Fryer J.G. The impact of arthritis in rural populations. *Arthritis Care Res.* 1995;8:242–250.
- 65- Tepper S., Hochberg M.C. Factors associated with hip osteoarthritis: Data from the first National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-I) *Am. J. Epidemiol.* 1993;137:1081–1088.
- 66- Jordan J.M., Helmick C.G., Renner J.B., Luta G., Dragomir A.D., Woodard J., Fang F., Schwartz T.A., Abbate L.M., Callahan L.F., et al. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: The Johnston County Osteoarthritis Project. *J. Rheumatol.* 2007;34:172–180.
- 67- Clark A.G., Jordan J.M., Vilim V.V., Renner J.B., Dragomir A.D., Luta G., Kraus V.B. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: The Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheumatol.* 1999;42:2356–2364.
- 68- Ray Marks Osteoarthritis and Articular Cartilage: Biomechanics and Novel Treatment Paradigms. *Advances in Aging Research.* 2014; 03(04): 12.
- 69- Structure et métabolisme du cartilage articulaire Eric Vignon Service de rhumatologie 28, centre hospitalier Lyon-Sud, 69495 Pierre-BBnite cedex, France.
- 70- Ng HY, Alvin Lee KX, Shen YF. Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. *JSM Bone and Joint Dis.* 2017;1(2): 1010.



- 71- Ofek G, Athanasiou KA. Micromechanical properties of chondrocytes and chondrons: relevance to articular cartilage tissue engineering. *Journal of Mechanics of Materials and Structures*. 2007; 2(6):1059–86.
- 72- Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng*. 2009;37(1-2):1-57.
- 73- Fassbender HG. *Articular cartilage and osteoarthritis*. Vienna: Hans Huber; 1983.
- 74- Hu J. *Chondrocyte self-assembly and culture in bioreactors* [Ph.D. Thesis] Houston: Rice University; 2005.
- 75- Buckwalter JA, Hunziker EB, Rosenberg LC, Coutts R, Adams M, Eyre D. Articular cartilage: composition and structure. In: Woo SL-Y, Buckwalter JA, editors. *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*. Park Ridge: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1991. pp. 405–425.
- 76- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte}matrix interactions. *AAOS Inst Course Lect*. 1998;47:477–486.
- 77- Wong M, Wuethrich P, Eggli P, Hunziker E. Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. *J Orthop Res*. 1996 May;14(3):424–432.
- 78- Siczkowski M, Watt FM. Subpopulations of chondrocytes from different zones of pig articular cartilage. Isolation, growth and proteoglycan synthesis in culture. *J Cell Sci*. 1990 Oct;97(Pt 2):349–360.
- 79- Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*. 2008;87:77–95.
- 80- Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat* 1967; 101: 753–763.
- 81- Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes, II: Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res* 1988; 18: 223–234.
- 82- Meachim G. Effect of age on the thickness of adult articular cartilage at the shoulder joint. *Ann Rheum Dis* 1971; 30: 43–46.
- 83- Gurr E, Mohr W, Pallasch G. Proteoglycans from human articular cartilage: The effect of joint location on the structure. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23: 811–819.
- 84- Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Rosenberg L. An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein and collagen in the matrix of articular cartilage. *J Cell Biol* 1982; 93: 921–937.
- 85- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat* 1984; 138: 113–138.
- 86- Poole CA. Articular cartilage chondrons: Form, function and failure: A review. *J Anat* 1997; 1991: 1–13.

- 87- Miosge N, Flachsbart K, Goetz W, et al. Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *Histochem J* 1994; 26: 939–945.
- 88- Poole AR. Cartilage in health and disease. In: McCarty DJ, Koopman WJ, eds. *Arthritis and allied conditions*, 12th ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger; 1993: 279–333.
- 89- Meachim G, Stockwell RA. The matrix. In: Freeman MAR, ed. *Adult articular cartilage*, 2nd ed. Turnbridge Wells, England: Pitman Medical; 1979: 1–67.
- 90- Benninghoff A. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. Zweiter Teil: Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. *Z Zellforschung* 1925; 2: 783–862.
- 91- Maroudas A, Wachtel E, Grushko G, et al. The effects of osmotic and mechanical pressure on water and partitioning in articular cartilage. *Biochem Biophys Acta*. 1991;1073:285-294.
- 92- Torzilli PA. The influence of cartilage confinement on its equilibrium water partition. *J Orthop Res*. 1985;3:473-483
- 93- Lai WM, Hou JS, Mow VC. A triphasic theory for the swelling and deformational behaviors of articular cartilage. *J Biomech Eng*. 1991;113:245-258
- 94- Linn FC, Sokoloff L. Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. *Arthritis Rheum*. 1965;8:481-494
- 95- Maroudas A. Physicochemical properties of articular cartilage. In: Freeman MAR, editor. , ed. *Adult Articular Cartilage*. Kent, United Kingdom: Cambridge University Press; 1979:215-290.
- 96- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage, part 1: tissue design and chondrocyte-matrix interaction. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79:600-611.
- 97- Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiments. *J Biomech Eng*. 1980;113:73-84
- 98- Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*. 1992;13:67-97
- 99- Eyre DR, Wu JJ, Woods PE. The cartilage collagens: Structural and metabolic studies. *J Rheumatol* 1991;(suppl 27)18:49–51.
- 100- Mendler M, Eich-Bender SV, Vaughan L, Winterhalter KM, Bruckner P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol* 1989; 108: 191–197.
- 101- Poole CA, Gilbert RT, Herbage D, Hartmann DJ. Immunolocalization of type IX collagen in normal and osteoarthritic canine tibial cartilage and isolated chondrons. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5: 191–204.
- 102- Schmid TM, Linsenmayer F. Immunohistochemical localization of short chain cartilage (type X) in avian tissue. *J Cell Biol* 1985; 100: 598–605.

- 103- Poole CA, Ayad S, Schofiel JR. Chondrons from articular cartilage (I): Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine chondrons. *J Cell Sci* 1988; 90: 635–645.
- 104- Wotton SF, Duance VC. Type III collagen in normal human articular cartilage. *Histochem J* 1994; 26: 412–416.
- 105- Van der Rest M, Mayne R. Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J Biol Chem* 1988; 263: 1615–1618.
- 106- Hardingham TE, Muir H. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *J Biochem* 1974; 139: 565–581.
- 107- Asari A, Miyauchi S, Kuriyama S, et al. Localization of hyaluronic acid in human articular cartilage. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 513–522.
- 108- Rosenberg LC, Choi HU, Tang LH, et al. Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J Biol Chem* 1985; 260: 6304–6313.
- 109- Mollenhauer J, Bee JA, Lizarbe MA, von der Mark K. Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol* 1984; 98: 1572–1579.
- 110- Saltner DM. Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 780–786.
- 111- Nishida K, Inoue H, Murakami T. Immunohistochemical demonstration of fibronectin in the most superficial layer of normal rabbit articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 995–998.
- 112- Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part I: basic science, historical perspective, patient evaluation and treatment options. *Am J Sports Med.* 2005;33:295-306
- 113- Brower TD, Akahoski Y, Orlic PL. Diffusion of dyes through articular cartilage in vivo. *J Bone Joint Surg [Am]* 1962; 44: 456–463.
- 114- Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992; 25: 155–163.
- 115- Smith MD, Walker JG. Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt, Weisman, editors. The synovium. *Rheumatology.* (5th ed) 2011;1:51–6.
- 116- Singh JA, Araysi T, Duray P, Schumacher HR. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:785–90.
- 117- Smith MD. The normal synovium. *Open Rheumatol J.* 2011;5:100-6.
- 118- Fam H., Bryant J.T., and Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology*, 2007. 44: 74-59.
- 119- Lo G.H., LaValley M., McAlindon T., and Felson D.T. Intra-articular Hyaluronic Acid in Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*, 2003. 290 (23): 3115-3121.
- 120- Madry, H., van Dijk, C.N. & Mueller-Gerbl, M. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18: 419.

- 121- Duncan H, Jundt J, Riddle JM, Pitchford W, Christopherson T. The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am.* 1987; 69:1212–1220.
- 122- Inoue H. Alterations in the collagen framework of osteoarthritic cartilage and subchondral bone. *Int Orthop.* 1981;5:47–52
- 123- Fischer H (1988) Darstellung und Anordnung der kollagenen Fibrillen in der Matrix des Gelenkknorpels. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universitaet Freiburg, Freiburg i.Br., Germany
- 124- Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J. (2010). Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67(24):4197-4211.
- 125- Hunter DJ. Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011.;25(1):801-814.
- 126- Goldring SR, Goldring MB. Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006; 6(4):376-378.
- 127- Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheum.* 2008; 22(2):351-384.
- 128- Sofat N. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90(5):463-479.
- 129- Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1192(1):230-237.
- 130- Struglics A, Hansson M. MMP proteolysis of the human extracellular matrix protein aggrecan is mainly a process of normal turnover. *Biochem J.* 2012;446(2):213-223.
- 131- Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, Im HJ. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene.* 2013a;527(2):440-447.
- 132- Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(3):224.
- 133- Goldring MB. Do mouse models reflect the diversity of osteoarthritis in humans? *Arthritis Rheum.* 2012; 64(10):3072-3075,
- 134- Conde J, Scotece M, Gomez R, Lopez V, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease. *Arthritis.* 2011.
- 135- Lohmander LS, Ionescu M, Jugessur H, Poole AR. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(3):534-44.
- 136- Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet.* 2005; 365(9463):965-973,
- 137- Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Berthiaume MJ, Abram F, Choquette D, Haraoui B, et al. Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in patients with osteoarthritis of the knee as assessed by quantitative magnetic resonance imaging over a 24-month period. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(5):683-688.

- 138- Cotofana S, Wyman BT, Benichou O, Dreher D, Nevitt M, Gardiner J, Wirth W, Hitzl, Kwoh CK, Eckstein F, Frobell RB, OAI Investigators Group. Relationship between knee pain and the presence, location, size and phenotype of femorotibial denuded areas of subchondral bone as visualized by MRI. *Osteoarthr Cartilage*. 2013;21(9):1214-1222.
- 139- Link TM, Steinbach LS, Ghosh S, Ries M, Lu Y, Lane N, et al. Osteoarthritis: MR imaging findings in different stages of disease and correlation with clinical findings *Radiology*. 2003 ;226(2003):373–381.
- 140- Kornaat PR, Bloem JL, Ceulemans RY, Riyazi N, Rosendaal FR, Nelissen RG, et al. Osteoarthritis of the knee: association between clinical features and MR imaging findings. *Radiology*. 2006; 239(3)811–817.
- 141- Bondeson JI, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, van den Berg WB. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Mar;62(3):647-57.
- 142- Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res*. 2004; 427:(Suppl):S37-46.
- 143- Im HJ, Li X, Muddasani P, Kim GH, Davis F, Rangan J, Forsyth CB, Ellman M, Thonar EJ. Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. *J Cell Physiol*. 2008; 215(2):452-63.
- 144- Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64(9):1263-1267.
- 145- Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, Goebel JC, Mainard D, Blum A, Pourel J, Netter P, Gillet P. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(11):3492-3501.
- 146- Sowers M, Karvonen-Gutierrez CA, Jacobson JA, Jiang Y, Yosef, M. Associations of anatomical measures from MRI with radiographically defined knee osteoarthritis score, pain, and physical functioning. *J Bone Joint Surg*. 2011; 93(3):241-251.
- 147- Englund M, Roemer FW, Hayashi D, Crema MD, Guermazi A. (2012). Meniscus pathology, osteoarthritis and the treatment controversy. *Nat Rev Rheum*. 2012;8(7): 412-419.
- 148- Vincent KR, Conrad BP, Fregly BJ, Vincent HK. The pathophysiology of osteoarthritis: a mechanical perspective on the knee joint. *PM&R*. 2012.;4(5):S3-S9.
- 149- 152- Witt KL, Vilensky JA. The anatomy of osteoarthritic joint pain. *Clin Anat*. , 2012; 27(3):451-454.

- 150- Ashraf S, Wibberley H, Mapp PI, Hill R, Wilson D, Walsh DA. Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011.;70(3):523-529.
- 151- Hattori N., Mochizuki S., Kishi K., et al. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *The American Journal of Pathology*. 2009;175(2):533–546. doi: 10.2353/ajpath.2009.081080.
- 152- Shi J., Son M.-Y., Yamada S., et al. Membrane-type MMPs enable extracellular matrix permissiveness and mesenchymal cell proliferation during embryogenesis. *Developmental Biology*. 2008;313(1):196–209. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.10.017.
- 153- Chubinskaya S., Kuettner K. E., Cole A. A. Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Laboratory Investigation*. 1999;79(12):1669–1677.
- 154- Gack S., Vallon R., Schmidt J., et al. Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth & Differentiation*. 1995;6(6):759–767.
- 155- Wu H., Du J., Zheng Q. Expression of MMP-1 in cartilage and synovium of experimentally induced rabbit ACLT traumatic osteoarthritis: immunohistochemical study. *Rheumatology International*. 2008;29(1):31–36. doi: 10.1007/s00296-008-0636-2.
- 156- Eguchi T., Kubota S., Kawata K., et al. Novel transcription factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Molecular and Cellular Biology*. 2008;28(7):2391–2413. doi: 10.1128/mcb.01288-07.
- 157- Warner R. L., Bhagavathula N., Nerusu K. C., et al. Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators in vitro. *Experimental and Molecular Pathology*. 2004;76(3):189–195. doi: 10.1016/j.yexmp.2004.01.003.
- 158- Okada Y., Shinmei M., Tanaka O., et al. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Laboratory Investigation*. 1992;66(6):680–690.
- 159- Kubota E., Imamura H., Kubota T., Shibata T., Murakami K.-I. Interleukin 1 $\beta$  and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1997;55(1):20–28. doi: 10.1016/s0278-2391(97)90438-9.
- 160- Shiomi T., Lemaître V., D'Armiento J., Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathology International*. 2010;60(7):477–496. doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02547.x.

- 161- Yammani R. R., Loeser R. F. Stress-inducible nuclear protein 1 regulates matrix metalloproteinase 13 expression in human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology*. 2014;66(5):1266–1271. doi: 10.1002/art.38391.
- 162- Xu Y., Huang Y., Cai D., Liu J., Cao X. Analysis of differences in the molecular mechanism of rheumatoid arthritis and osteoarthritis based on integration of gene expression profiles. *Immunology Letters*. 2015;168(2):246–253. doi: 10.1016/j.imlet.2015.09.011.
- 163- Porter S.; Clark I.M.; Kevorkian L. & Edwards D.R. (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J*. Vol.386, pp. 15-27.
- 164- Malfait A.M.; Liu R.Q.; Ijiri K.; Komiyama S. & Tortorella M.D. (2002) Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J. Biol. Chem*. Vol.277, pp. 22201-22208
- 165- Tortorella M.D.; Malfait A.M.; Deccico C. & Arner E. (2001) The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* Vol.9, pp. 539-552.
- 166- Janusz M.J.; Little C.B.; King L.E.; Hookfin E.B.; Brown K.K.; Heitmeyer S.A.; Caterson B.; Poole A.R. & Taiwo Y.O. (2004) Detection of aggrecanase- and MMP-generated catabolic neoepitopes in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* Vol.12, pp. 720-728.
- 167- Lohmander L.S.; Neame P.J. & Sandy J.D. (1993b) The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid: evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. Vol.36, pp. 1214-1222.
- 168- Sandy J.D.; Flannery C.R.; Neame P.J. & Lohmander L.S. (1992) The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J. Clin. Invest*. Vol.89, pp. 1512-1516.
- 169- Collins-Racie L.A.; Flannery C.R.; Zeng W.; Corcoran C.; Annis-Freeman B.; Agostino M.J.; Arai M.; DiBlasio-Smith E.; Dorner A.J.; Georgiadis K.E.; Jin M.; Tan X.Y.; Morris E.A. & LaVallie E.R. (2004) ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage. *Matrix Biol*. Vol.23, pp. 219-230.
- 170- Rodríguez-Manzaneque J.C.; Westling J.; Thai S.N.M.; Luque A.; Knäuper V.; Murphy G.; Sandy J.D. & Iruela-Arispe M.L. (2002) ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. Vol.293, pp. 501-508.
- 171- Tortorella M.D.; Liu R.Q.; Burn T.; Newton R.C. & Arner E. (2002) Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4). *Matrix Biol*. Vol.21, pp. 499-511

- 172- Naito S.; Shiomi T.; Okada A.; Kimura T.; Chijiwa M.; Fujita Y.; Yatabe T.; Komiya K.; Enomoto H.; Fujikawa K. & Okada Y. (2007) Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol. Int.* Vol.57, pp. 703- 711.
- 173- Pratta M.A.; Yao W.; Decicco C.; Tortorella M.D.; Liu R.Q.; Copeland R.A.; Magolda R.; Newton R.C.; Trzaskos J.M. & Arner E.C. (2003) Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* Vol.278, pp. 45539-45545.
- 174- Glasson S.S.; Askew R.; Sheppard B.; Carito B.; Blanchet T.; Ma H.L.; Flannery C.R.; Peluso D.; Kanki K.; Yang Z.; Majumdar M.K. & Morris E.A. (2005) Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* Vol.434, pp. 644-648.
- 175- Stanton H.; Rogerson F.M.; East C.J.; Golub S.B.; Lawlor K.E.; Meeker C.T.; Little C.B.; Last K.; Farmer P.J.; Campbell I.K.; Fourie A.M. & Fosang A.J. (2005) ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* Vol.434, pp. 648- 652.
- 176- Song R.H.; Tortorella M.D.; Malfait A.M.; Alston J.T.; Yang Z.; Arner E.C. & Griggs D.W. (2007) Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* Vol.56, pp. 575-585.
- 177- Roach H.I.; Yamada N.; Cheung K.S.; Tilley S.; Clarke N.M.; Oreffo R.O.; Kokubun S. & Bronner F. (2005) Association between the abnormal expression of matrixdegrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.* Vol.52, pp. 3110- 3124.
- 178- Bau B.; Gebhard P.M.; Haag J.; Knorr T.; Bartnik E. & Aigner T. (2002) Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum.* Vol.46, pp. 2648-2657.
- 179- Plaas A.; Osborn B.; Yoshihara Y.; Bai Y.; Bloom T.; Nelson F.; Mikecz K. & Sandy J.D. (2007) Aggrecanolysis in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages. *Osteoarthritis Cartilage* Vol.15, pp. 719-734.
- 180- Rodriguez-Lopez J.; Mustafa Z.; Pombo-Suarez M.; Malizos K.N.; Rego I.; Blanco F.J.; Tsezou A.; Loughlin J.; Gomez-Reino J.J. & Gonzalez A. (2008) Genetic variation including nonsynonymous polymorphisms of a major aggrecanase, ADAMTS-5, in susceptibility to osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* Vol.58, pp. 435-441.
- 181- Kevorkian L.; Young D.A.; Darrah C.; Donell S.T.; Shepstone L.; Porter S.; Brockbank S.M.; Edwards D.R.; Parker A.E. & Clark I.M. (2004) Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum.* Vol.50, pp. 131- 141
- 182- Michael B. Mueller, Rocky S. Tuan. *Anabolic/Catabolic Balance in Pathogenesis of Osteoarthritis: Identifying Molecular Targets.* The American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation, 2011.



- 183- D.R. Edwards, G. Murphy, J.J. Reynolds, et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J.* 1987; 6: 1899–1904.
- 184- H.M. van Beuningen, P.M. van der Kraan, O.J. Arntz, W.B. van den Berg. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest.* 1994; 71: 279–290.
- 185- E.N. Blaney Davidson, A. Scharstuhl, E.L. Vitters, P.M. van der Kraan, W.B. van den Berg. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: Role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: R1338–R1347.
- 186- N. Fukui, Y. Zhu, W.J. Maloney, J. Clohisy, L.J. Sandell. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85-A(Suppl 3): 59–66.
- 187- M.K. Majumdar, P.S. Chockalingam, R.A. Bhat, et al. Immortalized mouse articular cartilage cell lines retain chondrocyte phenotype and respond to both anabolic factor BMP-2 and pro-inflammatory factor IL-1. *J Cell Physiol.* 2008; 215: 68–76.
- 188- S. Chubinskaya, D. Segalite, D. Pikovsky, A.A. Hakimiyan, D.C. Rueger. Effects induced by BMPS in cultures of human articular chondrocytes: Comparative studies. *Growth Factors.* 2008; 26: 275–283.
- 189- Gavenis K, Pufe T, Brandenburg LO, Schiffel K, Schmidt-Rohlfing B. Effects of controlled released BMP-7 on markers of inflammation and degradation during the cultivation of human osteoarthritic chondrocytes [published online ahead of print July 12, 2010]. *J Biomater Appl.*
- 190- D. Bobinac, J. Spanjol, M. Marinovic, et al. Expression of bone morphogenetic proteins, cartilage-derived morphogenetic proteins and related receptors in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Coll Antropol.* 2008; 32(Suppl 2): 83–87.
- 191- M. Hayashi, T. Muneta, T. Takahashi, Y.J. Ju, K. Tsuji, I. Sekiya. Intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 retard progression of existing cartilage degeneration. *J Orthop Res.* 2010; 28: 1502–1506.
- 192- S. Chubinskaya, M. Hurtig, D.C. Rueger. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop.* 2007; 31: 773–781.
- 193- G. Tardif, D. Hum, J.P. Pelletier, C. Boileau, P. Ranger, J. Martel-Pelletier. Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2521–2530.
- 194- G. Tardif, J.P. Pelletier, C. Boileau, J. Martel-Pelletier. The BMP antagonists follistatin and gremlin in normal and early osteoarthritic cartilage: An immunohistochemical study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009; 17: 263–270.

- 195- F.P. Luyten, P. Chen, V. Paralkar, A.H. Reddi. Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-beta 1, and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro. *Exp Cell Res.* 1994; 210: 224–229.
- 196- F.P. Luyten, Y.M. Yu, M. Yanagishita, S. Vukicevic, R.G. Hammonds, A.H. Reddi. Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenetic protein-2B are equipotent in the maintenance of proteoglycans in bovine articular cartilage explant cultures. *J Biol Chem.* 1992; 267: 3691–3695.
- 197- P.M. van der Kraan, E.N. Davidson, W.B. van den Berg. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: To serve and protect or a wolf in sheep clothing's?. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010; 18: 735–741.
- 198- F.P. Luyten, V.C. Hascall, S.P. Nissley, T.I. Morales, A.H. Reddi. Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys.* 1988; 267: 416–425.
- 199- S.B. Trippel, M.T. Corvol, M.F. Dumontier, R. Rappaport, H.H. Hung, H.J. Mankin. Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr Res.* 1989; 25: 76–82
- 200- K.J. Ekenstedt, W.E. Sonntag, R.F. Loeser, B.R. Lindgren, C.S. Carlson. Effects of chronic growth hormone and insulin-like growth factor 1 deficiency on osteoarthritis severity in rat knee joints. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 3850–3858.
- 201- S. Dore, J.P. Pelletier, J.A. DiBattista, G. Tardif, P. Brazeau, J. Martel-Pelletier. Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1-binding proteins. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 253–263.
- 202- X. Chevalier, J.A. Tyler. Production of binding proteins and role of the insulin-like growth factor I binding protein 3 in human articular cartilage explants. *Br J Rheumatol.* 1996; 35: 515–522.
- 203- T. Eviatar, H. Kauffman, A. Maroudas. Synthesis of insulin-like growth factor binding protein 3 in vitro in human articular cartilage cultures. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 410–417.
- 204- R.K. Studer, E. Levicoff, H. Georgescu, L. Miller, D. Jaffurs, C.H. Evans. Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: Inhibition of IGF-IRbeta tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279: C961–C969.
- 205- J. Wang, D. Elewaut, E.M. Veys, G. Verbruggen. Insulin-like growth factor 1-induced interleukin-1 receptor II overrides the activity of interleukin-1 and controls the homeostasis of the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 1281–1291.
- 206- Dinarello CA. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol.* 2013;25(6):389–393.
- 207- Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America. 1984;81:7907–7911. *The Journal of Immunology*, vol. 178, no. 9, pp. 5413–5417, 2007.
- 208- Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(12):1484–1499.
- 209- Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 1998;41(12):2165–2174.
- 210- Szekanecz Z, Koch AE. Cell-cell interactions in synovitis. Endothelial cells and immune cell migration. *Arthritis Research*. 2000;2(5):368–373.
- 211- Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, et al. Can altered production of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin E2 by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002;10(6):491–500.
- 212- Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1993;52(12):870–875.
- 213- Sohn DH, Sokolove J, Sharpe O, et al. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Research and Therapy*. 2012;14(1, article R7)
- 214- Symons JA, Young PR, Duff GW. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 $\beta$  precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(5):1714–1718.
- 215- Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Seminars in Immunology*. 2013;25(6):394–407.
- 216- Palmer G, Guerne P-A, Mezin F, et al. Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. *Arthritis Research*. 2002;4(3):226–231.
- 217- Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis and Rheumatism*. 1996;39(9):1535–1544.
- 218- Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes: identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis and Rheumatism*. 1992;35(5):530–540.
- 219- Sadouk MB, Pelletier J-P, Tardif G, Kiansa K, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA: the increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Laboratory Investigation*. 1995;73(3):347–355.

- 220- Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF- $\kappa$ B signaling: multiple angles to target OA. *Current Drug Targets*. 2010;11(5):599–613.
- 221- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, John T, Mobasheri A. Curcumin protects human chondrocytes from IL-1 $\beta$ -induced inhibition of collagen type II and  $\beta$ 1-integrin expression and activation of caspase-3: an immunomorphological study. *Annals of Anatomy*. 2005;187(5-6):487–497.
- 222- Stöve J, Huch K, Günther K-P, Scharf H-P. Interleukin-1 $\beta$  induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro . *Pathobiology*. 2000;68(3):144–149.
- 223- Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis & Rheumatology*. 2000;43(4):801–811.
- 224- Meszaros E, Malemud CJ. Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2012;3(5):219–229.
- 225- Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112(12):3507–3514.
- 226- Koshy PJT, Lundy CJ, Rowan AD, et al. The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46(4):961–967.
- 227- Ye Z, Chen Y, Zhang R, et al. c-Jun N-terminal kinase—c-Jun pathway transactivates Bim to promote osteoarthritis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2014;92(2):132–139.
- 228- Héraud F, Héraud A, Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2000;59(12):959–965.
- 229- Aigner T, McKenna L, Zien A, Fan Z, Gebhard PM, Zimmer R. Gene expression profiling of serum- and interleukin-1 $\beta$ -stimulated primary human adult articular chondrocytes - A molecular analysis based on chondrocytes isolated from one donor. *Cytokine*. 2005;31(3):227–240.
- 230- Pulsatelli L, Dolzani P, Piacentini A, et al. Chemokine production by human chondrocytes. *Journal of Rheumatology*. 1999;26(9):1992–2001.
- 231- El Mansouri FE, Chabane N, Zayed N, et al. Contribution of H3K4 methylation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*. 2011;63(1):168–179.

- 232- Hardy MM, Seibert K, Manning PT, et al. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46(7):1789–1803.
- 233- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007;74(4):324–329.
- 234- MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cellular Signalling*. 2002;14(6):477–492.
- 235- Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83(5):793–802.
- 236- Westacott CI, Barakat AF, Wood L, et al. Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2000;8(3):213–221.
- 237- Webb GR, Westacott CI, Elson CJ. Osteoarthritic synovial fluid and synovium supernatants up-regulate tumor necrosis factor receptors on human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1998;6(3):167–176.
- 238- Steenvoorden MMC, Bank RA, Runday HK, Toes REM, Huizinga TWJ, DeGroot J. Fibroblast-like synoviocyte-chondrocyte interaction in cartilage degradation. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2007;25(2):239–245.
- 239- Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier J-P, et al. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF- $\alpha$ . *Journal of Rheumatology*. 1997;24(10):1985–1994.
- 240- Henderson B, Pettipher ER. Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor  $\alpha$  in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo. *Clinical and Experimental Immunology*. 1989;75(2):306–310.
- 241- Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF- $\kappa$ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006;14(9):839–848.
- 242- Saklatvala J. Tumour necrosis factor  $\alpha$  stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature*. 1986;322(6079):547–549.
- 243- Séguin CA, Bernier SM. TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology*. 2003;197(3):356–369.
- 244- Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*. 1990;1052(3):366–378.

- 245- Xue J, Wang J, Liu Q, Luo A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces ADAMTS-4 expression in human osteoarthritis chondrocytes. *Molecular Medicine Reports*. 2013;8(6):1755–1760.
- 246- Joos H, Wildner A, Hogrefe C, Reichel H, Brenner RE. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage. *Arthritis Research & Therapy*. 2013;15(5, article R119)
- 247- López-Armada MJ, Caramés B, Martín MA, et al. Mitochondrial activity is modulated by TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006;14(10):1011–1022.
- 248- Guerne P-A, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro . *Journal of Immunology*. 1990;144(2):499–505.
- 249- Alaaeddine N, Olee T, Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Lotz M. Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and role in cartilage degradation. *Arthritis & Rheumatology*. 2001;44(7):1633–1643.
- 250- Honorati MC, Cattini L, Facchini A. VEGF production by osteoarthritic chondrocytes cultured in micromass and stimulated by IL-17 and TNF- $\alpha$  . *Connective Tissue Research*. 2007;48(5):239–245.
- 251- El Mansouri FE, Chabane N, Zayed N, et al. Contribution of H3K4 methylation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*. 2011;63(1):168–179.
- 252- Hardy MM, Seibert K, Manning PT, et al. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46(7):1789–1803.
- 253- Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2003;33(3):155–167.
- 254- Bender S, Haubeck H-D, Van de Leur E, et al. Interleukin-1 $\beta$  induces synthesis and secretion of interleukin-6 in human chondrocytes. *FEBS Letters*. 1990;263(2):321–324.
- 255- Distel E, Cadoudal T, Durant S, Poignard A, Chevalier X, Benelli C. The infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: an important source of interleukin-6 and its soluble receptor. *Arthritis and Rheumatism*. 2009;60(11):3374–3377.
- 256- Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines, Cellular and Molecular Therapy*. 2000;6(2):71–79.
- 257- Livshits G, Zhai G, Hart DJ, et al. Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: the Chingford Study. *Arthritis and Rheumatism*. 2009;60(7):2037–2045.

- 258- Porée B, Kypriotou M, Chadjichristos C, et al. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1·Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(8):4850–4865.
- 259- Cawston TE, Curry VA, Summers CA, et al. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis & Rheumatology*. 1998;41(10):1760–1771.
- 260- Sui Y, Lee JH, DiMicco MA, et al. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor  $\alpha$  in immature bovine and adult human articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism*. 2009;60(10):2985–2996.
- 261- Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2004;15(1):49–60.
- 262- Chenoufi H-L, Diamant M, Rieneck K, Lund B, Stein GS, Lian JB. Increased mRNA expression and protein secretion of interleukin-6 in primary human osteoblasts differentiated in vitro from rheumatoid and osteoarthritic bone. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001;81(4):666–678.
- 263- Sakao K, Takahashi KA, Arai Y, et al. Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8, and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2009;27(4):412–423.
- 264- Wang P, Zhu F, Konstantopoulos K. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation. *American Journal of Physiology—Cell Physiology*. 2010;298(6):C1445–C1456.
- 265- Liu X-H, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. The role of the interleukin-6/gp130 signaling pathway in bone metabolism. *Vitamins and Hormones*. 2006;74:341–355.
- 266- Hooge ASK, van de Loo FAJ, Bennink MB, Arntz OJ, de Hooge P, van den Berg WB. Male IL-6 gene knock out mice developed more advanced osteoarthritis upon aging. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(1):66–73.
- 267- Van de Loo FAJ, Kuiper S, van Enkevort FHJ, Arntz OJ, van den Berg WB. Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis: a study in interleukin-6-deficient mice. *American Journal of Pathology*. 1997;151(1):177–191.
- 268- Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:19–49.
- 269- Baslund B, Tvede N, Danneskiold-Samsoe B, et al. Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study. *Arthritis and Rheumatism*. 2005;52(9):2686–2692.

- 270- McInnes IB, Al-Mughales J, Field M, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nature Medicine*. 1996;2(2):175–182.
- 271- Scanzello CR, Umoh E, Pessler F, et al. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009;17(8):1040–1048.
- 272- Sun JM, Sun LZ, Liu J, Su BH, Shi L. Serum interleukin-15 levels are associated with severity of pain in patients with knee osteoarthritis. *Disease Markers*. 2013;35(3):203–206.
- 273- Chang SH, Dong C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cell Signaling*. 2011;23(7):1069–1075.
- 274- Zhang X, Angkasekwinai P, Dong C, Tang H. Structure and function of interleukin-17 family cytokines. *Protein and Cell*. 2011;2(1):26–40.
- 275- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:485–517.
- 276- Suurmond J, Dorjee AL, Boon MR, et al. Mast cells are the main interleukin-17-positive cells in anti-citrullinated protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. *Arthritis Research & Therapy*. 2011;13(5, article R150)
- 277- Honorati MC, Neri S, Cattini L, Facchini A. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006;14(4):345–352.
- 278- Alsalameh S, Mollenhauer J, Hain N, Stock K-P, Kalden JR, Burmester GR. Cellular immune response toward human articular chondrocytes: T cell reactivities against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases. *Arthritis and Rheumatism*. 1990;33(10):1477–1486.
- 279- Chen B, Deng Y, Tan Y, Qin J, Chen LB. Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations. *Journal of International Medical Research*. 2014;42(1):138–144.
- 280- Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, van den Gersselaar LA, van den Berg WB. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis & Rheumatology*. 2000;43(6):1300–1306.
- 281- Benderdour M, Tardif G, Pelletier J-P, et al. Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1 $\beta$ . *Journal of Rheumatology*. 2002;29(6):1262–1272.
- 282- Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. *Arthritis and Rheumatism*. 1997;40(6):1050–1053.



- 283- Honorati MC, Bovara M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A. Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002;10(10):799–807.
- 284- Han L, Lee HS, Yoon JH, et al. Association of IL-17A and IL-17F single nucleotide polymorphisms with susceptibility to osteoarthritis in a Korean population. *Gene*. 2014;533(1):119–122.
- 285- Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *Journal of Immunology*. 1999;162(2):1096–1100.
- 286- Möller B, Kukoc-Zivojnov N, Kessler U, et al. Interferon-gamma induces expression of interleukin-18 binding protein in fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology*. 2003;42(3):442–445.
- 287- Peng C-Z, Cao J-M, Xiao T, et al. Concentration of IL-18 and PGE2 in synovial fluid in patients with osteoarthritis and its significance. *Journal of Central South University*. 2006;31(6):862–865.
- 288- Denoble AE, Huffman KM, Stabler TV, et al. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(5):2088–2093.
- 289- Hulin-Curtis SL, Bidwell JL, Perry MJ. Evaluation of IL18 and IL18R1 polymorphisms: genetic susceptibility to knee osteoarthritis. *International Journal of Immunogenetics*. 2012;39(2):106–109.
- 290- Omair A, Lie BA, Reikeras O, Brox JI. An association study of interleukin 18 receptor genes (IL18R1 and IL18RAP) in lumbar disc degeneration. *The Open Orthopaedics Journal*. 2012;6:164–171
- 291- Dai S-M, Shan Z-Z, Nishioka K, Yudoh K. Implication of interleukin 18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis: direct effect on chondrocytes may not be pivotal. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005;64(5):735–742.
- 292- Joosten LAB, Smeets RL, Koenders MI, et al. Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction. *American Journal of Pathology*. 2004;165(3):959–967.
- 293- John T, Kohl B, Mobasher A, Ertel W, Shakibaei M. Interleukin-18 induces apoptosis in human articular chondrocytes. *Histology and Histopathology*. 2007;22(5):469–482.
- 294- Futani H, Okayama A, Matsui K, et al. Relation between interleukin-18 and PGE2 in synovial fluid of osteoarthritis: a potential therapeutic target of cartilage degradation. *Journal of Immunotherapy*. 2002;25(supplement 1):S61–S64.
- 295- Cho M-L, Jung YO, Moon Y-M, et al. Interleukin-18 induces the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via AP-1-dependent pathways. *Immunology Letters*. 2006;103(2):159–166.

- 296- V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos, Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 639–645.
- 297- J.F. Turrens, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.* 552 (2003) 335–344.
- 298- J.S. Gibson, D. McCartney, J. Sumpter, T.P. Fairfax, P.I. Milner, H.L. Edwards, R.J. Wilkins, Rapid effects of hypoxia on H<sup>+</sup> homeostasis in articular chondrocytes, *Pflugers Arch.* 458 (2009) 1085–1092.
- 299- C.L. Fattman, L.M. Schaefer, T.D. Oury, Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 236–256.
- 300- D. Trachootham, W. Lu, M.A. Ogasawara, R.D. Nilsa, P. Huang, Redox regulation of cell survival, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 1343–1374.
- 301- D.J. Betteridge, What is oxidative stress? *Metabolism* 49 (2000) 3–8.
- 302- D.P. Jones, Radical-free biology of oxidative stress, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295 (2008) C849–C868.
- 303- Y. Henrotin, G. Deby-Dupont, C. Deby, M. De Bruyn, M. Lamy, P. Franchimont, Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes, *Br. J. Rheumatol.* 32 (1993) 562–567.
- 304- C. Rathakrishnan, K. Tiku, A. Raghavan, M.L. Tiku, Release of oxygen radicals by articular chondrocytes: a study of luminol-dependent chemiluminescence and hydrogen peroxide secretion, *J. Bone Miner. Res.* 7 (1992) 1139–1148.
- 305- M.L. Tiku, J.B. Liesch, F.M. Robertson, Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines, *J. Immunol.* 145 (1990) 690–696.
- 306- Y.E. Henrotin, P. Bruckner, J.P. Pujol, The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage, *Osteoarthr. Cartil.* 11 (2003) 747–755.
- 307- M.A. Altay, C. Erturk, A. Bilge, M. Yapti, A. Levent, N. Aksoy, Evaluation of prolidase activity and oxidative status in patients with knee osteoarthritis: relationships with radiographic severity and clinical parameters, *Rheumatol. Int.* (2015).
- 308- C. Erturk, M.A. Altay, S. Selek, A. Kocyigit, Paraoxonase-1 activity and oxidative status in patients with knee osteoarthritis and their relationship with radiological and clinical parameters, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 72 (2012) 433–439.
- 309- O. Altindag, O. Erel, N. Aksoy, S. Selek, H. Celik, M. Karaoglanoglu, Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis, *Rheumatol. Int.* 27 (2007) 339–344.
- 310- C.M. Davies, F. Guilak, J.B. Weinberg, B. Fermor, Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis, *Osteoarthr. Cartil.* 16 (2008) 624–630.
- 311- A. Karan, M.A. Karan, P. Vural, N. Erten, C. Tascioglu, C. Aksoy, M. Canbaz, A. Oncel, Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis, *Clin. Rheumatol.* 22 (2003) 397–399.

- 312- H. Sakurai, H. Kohsaka, M.F. Liu, H. Higashiyama, Y. Hirata, K. Kanno, I. Saito, N. Miyasaka, Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 2357–2363.
- 313- Y. Ersoy, E. Ozerol, O. Baysal, I. Temel, R.S. MacWalter, U. Meral, Z.E. Altay, Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 61 (2002) 76–78.
- 314- O.V. Nemirovskiy, M.R. Radabaugh, P. Aggarwal, C.L. Funckes-Shippy, S.J. Mnich, D.M. Meyer, T. Sunyer, W. Rodney Mathews, T.P. Misko, Plasma 3-nitrotyrosine is a biomarker in animal models of arthritis: pharmacological dissection of iNOS' role in disease, *Nitric Oxide* 20 (2009) 150–156.
- 315- A. Ostalowska, E. Birkner, M. Wiecha, S. Kasperczyk, A. Kasperczyk, D. Kapolka, A. Zon-Giebel, Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint, *Osteoarthr. Cartil.* 14 (2006) 139–145.
- 316- M.D. Carlo Jr., R.F. Loeser, Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 3419–3430.
- 317- T.S. Hiran, P.J. Moulton, J.T. Hancock, Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 23 (1997) 736–743.
- 318- P.J. Moulton, M.B. Goldring, J.T. Hancock, NADPH oxidase of chondrocytes contains an isoform of the gp91phox subunit, *Biochem. J.* 329 (Pt 3) (1998) 449–451.
- 319- P.L. van Lent, K.C. Nabbe, A.B. Blom, A. Sloetjes, A.E. Holthuysen, J. Kolls, F.A. Van De Loo, S.M. Holland, W.B. Van Den Berg, NADPH-oxidase-driven oxygen radical production determines chondrocyte death and partly regulates metalloproteinase-mediated cartilage matrix degradation during interferon-gamma-stimulated immune complex arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) R885–R895.
- 320- R.M. Palmer, M.S. Hickery, I.G. Charles, S. Moncada, M.T. Bayliss, Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193 (1993) 398–405.
- 321- J.P. Pelletier, V. Lascau-Coman, D. Jovanovic, J.C. Fernandes, P. Manning, J.R. Connor, M.G. Currie, J. Martel-Pelletier, Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors, *J. Rheumatol.* 26 (1999) 2002–2014.
- 322- F. Berenbaum, Signaling transduction: target in osteoarthritis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 16 (2004) 616–622.
- 323- Q.W. Xie, Y. Kashiwabara, C. Nathan, Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase, *J. Biolumin. Chemilumin.* 269 (1994) 4705–4708.
- 324- J. Martel-Pelletier, F. Mineau, D. Jovanovic, J.A. Di Battista, J.P. Pelletier, Mitogenactivated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes:

- possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK), *Arthritis Rheum.* 42 (1999) 2399–2409.
- 325- M.G. Attur, R.N. Patel, S.B. Abramson, A.R. Amin, Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 1050–1053.
- 326- A.R. Amin, P.E. Di Cesare, P. Vyas, M. Attur, E. Tzeng, T.R. Billiar, S.A. Stuchin, S.B. Abramson, The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 2097–2102.
- 327- D.R. Blake, P. Merry, J. Unsworth, B.L. Kidd, J.M. Outhwaite, R. Ballard, C.J. Morris, L. Gray, J. Lunec, Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint, *Lancet* 1 (1989) 289–293.
- 328- M. Koike, H. Nojiri, Y. Ozawa, K. Watanabe, Y. Muramatsu, H. Kaneko, D. Morikawa, K. Kobayashi, Y. Saita, T. Sasho, T. Shirasawa, K. Yokote, K. Kaneko, T. Shimizu, Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11722.
- 329- B.R. Beecher, J.A. Martin, D.R. Pedersen, A.D. Heiner, J.A. Buckwalter, Antioxidants block cyclic loading induced chondrocyte death, *Iowa Orthop. J.* 27 (2007) 1–8.
- 330- B. Fermor, S.E. Christensen, I. Youn, J.M. Cernanec, C.M. Davies, J.B. Weinberg, Oxygen, nitric oxide and articular cartilage, *Eur. Cell. Mater.* 13 (2007) 56–65 discussion 65.
- 331- R. Radi, Peroxynitrite reactions and diffusion in biology, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 720–721.
- 332- P Lepetsos, A G. Papavassiliou, ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1862, Issue 4, 2016, Pages 576-591,
- 333- W. Yin, J.I. Park, R.F. Loeser, Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and MEK–ERK MAPK signaling pathways, *J. Biolumin. Chemilumin.* 284 (2009) 31972–31981.
- 334- S.M. Yu, S.J. Kim, The thymoquinone-induced production of reactive oxygen species promotes dedifferentiation through the ERK pathway and inflammation through the p38 and PI3K pathways in rabbit articular chondrocytes, *Int. J. Mol. Med.* 35 (2015) 325–332.
- 335- Y.Y. Lo, J.M. Wong, T.F. Cruz, Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases, *J. Biolumin. Chemilumin.* 271 (1996) 15703–15707.
- 336- Y.Y. Lo, T.F. Cruz, Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes, *J. Biolumin. Chemilumin.* 270 (1995) 11727–11730.

- 337- Y.Y. Lo, J.A. Conquer, S. Grinstein, T.F. Cruz, Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species, *J. Cell. Biochem.* 69 (1998) 19–29.
- 338- J.P. Pelletier, F. Mineau, P. Ranger, G. Tardif, J. Martel-Pelletier, The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation, *Osteoarthr. Cartil.* 4 (1996) 77–84.
- 339- A.R. Amin, M. Attur, R.N. Patel, G.D. Thakker, P.J. Marshall, J. Rediske, S.A. Stuchin, I.R. Patel, S.B. Abramson, Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 1231–1237.
- 340- C. Boileau, J. Martel-Pelletier, F. Moldovan, J.Y. Jouzeau, P. Netter, P.T. Manning, J.P. Pelletier, The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1-converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 2637–2647.
- 341- D. Salvemini, T.P. Misko, J.L. Masferrer, K. Seibert, M.G. Currie, P. Needleman, Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 7240–7244.
- 342- L.M. Landino, B.C. Crews, M.D. Timmons, J.D. Morrow, L.J. Marnett, Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 15069–15074.
- 343- M. Whiteman, J.P. Spencer, Y.Z. Zhu, J.S. Armstrong, J.T. Schantz, Peroxynitrite modified collagen-II induces p38/ERK and NF-kappaB-dependent synthesis of prostaglandin E2 and nitric oxide in chondrogenically differentiated mesenchymal progenitor cells, *Osteoarthr. Cartil.* 14 (2006) 460–470.
- 344- Y.E. Henrotin, S.X. Zheng, G.P. Deby, A.H. Labasse, J.M. Crielaard, J.Y. Reginster, Nitric oxide downregulates interleukin 1beta (IL-1beta) stimulated IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 production by human chondrocytes, *J. Rheumatol.* 25 (1998) 1595–1601.
- 345- R.M. Clancy, J. Leszczynska-Piziak, S.B. Abramson, Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase, *J. Clin. Invest.* 90 (1992) 1116–1121.
- 346- M. Mathy-Hartert, G.P. Deby-Dupont, J.Y. Reginster, N. Ayache, J.P. Pujol, Y.E. Henrotin, Regulation by reactive oxygen species of interleukin-1beta, nitric oxide and prostaglandin E (2) production by human chondrocytes, *Osteoarthr. Cartil.* 10 (2002) 547–555.
- 347- M.E. Ginn-Pease, R.L. Whisler, Redox signals and NF-kappaB activation in T cells, *Free Radic. Biol. Med.* 25 (1998) 346–361.

- 348- Gilroy D.W., Newson J., Sawmynaden P., Willoughby D.A., Croxtall J.D. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB J.* 2004;18(3):489–498.
- 349- S. Malki, F. Declosmenil, A Farhat, B Moniot, F Poulat et B Boizet-Bonhoure. La prostaglandine D2 - Nouveaux rôles dans la gonade embryonnaire et pathologique. *Med Sci (Paris)*, 24 2 (2008) 177-184.
- 350- Alvarez-Soria, M.A., et al., Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis: differential proinflammatory cytokine profile between celecoxib and aceclofenac. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65(8): p. 998-1005.
- 351- Lippiello, L. , Yamamoto, K. , Robinson, D. and Mankin, H. J. (1978), Involvement of prostaglandins from rheumatoid synovium in inhibition of articular cartilage metabolism. *Arthritis & Rheumatism*, 21: 909-917.
- 352- McCoy, J.M., J.R. Wicks, and L.P. Audoly, The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 2002. 110(5): p. 651-8.
- 353- Jones, I.L., A. Klamfeldt, and M.B. McGuire, Enhanced breakdown of bovine articular cartilage proteoglycans by conditioned synovial medium. The effect of serum and dextran sulphate. *Scand J Rheumatol*, 1982. 11(1): p. 41-6.
- 354- He, W., et al., Synthesis of interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. *J Rheumatol*, 2002. 29(3): p. 546-53.
- 355- Choi, Y.A., et al., Interleukin-1beta stimulates matrix metalloproteinase-2 expression via a prostaglandin E2-dependent mechanism in human chondrocytes. *Exp Mol Med*, 2004. 36(3): p. 226-32.
- 356- Tung, J.T., et al., Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin- 1beta-stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *Am J Vet Res*, 2002. 63(7): p. 987-93.
- 357- Faour, W.H., et al., Prostaglandin E2 stimulates p53 transactivational activity through specific serine 15 phosphorylation in human synovial fibroblasts. Role in suppression of c/EBP/NF-kappaB-mediated MEKK1-induced MMP-1 expression. *J Biol Chem*, 2006. 281(29): p. 19849-60.
- 358- Notoya, K., et al., The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol*, 2000. 165(6): p. 3402-10.

- 359- Miwa, M., et al., Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E (2) through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(1): p. 17-24.
- 360- Hamberg M., Fredholm B. B. 1976. Isomerization of prostaglandin H<sub>2</sub> into prostaglandin D<sub>2</sub> in the presence of serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 431: 189–193. doi: 10.1016/0005-2760(76)90273-3
- 361- Kostenis E., Ulven T. 2006. Emerging roles of DP and CRTH2 in allergic inflammation. *Trends Mol. Med.* 12: 148–158. doi: 10.1016/j.molmed.2006.02.005
- 362- Ueno R., Honda K., Inoué S., Hayaishi O. 1983. Prostaglandin D<sub>2</sub>, a cerebral sleep-inducing substance in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 1735–1737. doi: 10.1073/pnas.80.6.1735
- 363- Hirai H., Tanaka K., Yoshie O., Ogawa K., Kenmotsu K., Takamori Y., Ichimasa M., Sugamura K., Nakamura M., Takano S., Nagata K. 2001. Prostaglandin D<sub>2</sub> selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.* 193: 255–261. doi: 10.1084/jem.193.2.255
- 364- Honda K., Arima M., Cheng G., Taki S., Hirata H., Eda F., Fukushima F., Yamaguchi B., Hatano M., Tokuhisa T., Fukuda T. 2003. Prostaglandin D<sub>2</sub> reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine. *J. Exp. Med.* 198: 533–543. doi: 10.1084/jem.20022218
- 365- Zayed N, Li X, Chabane N, et al. Augmentation de l'expression de la prostaglandine D<sub>2</sub> synthase de type lipocaline dans le cartilage arthrosique. *Arthritis Res Ther* . 2008; 10 (6): R146.
- 366- Kagitani-Shimono, K. , Mohri, I. , Oda, H. , Ozono, K. , Suzuki, K. , Urade, Y. and Taniike, M. (2006), Lipocalin-type prostaglandin D synthase ( $\beta$ -trace) is upregulated in the  $\alpha$ B-crystallin-positive oligodendrocytes and astrocytes in the chronic multiple sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 32: 64-73.
- 367- Hirawa N, Uehara Y, Ikeda T, Gomi T, Hamano K, Totsuka Y, Yamakado M, Takagi M, Eguchi N, Oda H, Seiki K, Nakajima H, Urade Y: Urinary Prostaglandin D Synthase ( $\beta$ -Trace) Excretion Increases in the Early Stage of Diabetes mellitus. *Nephron* 2001;87:321-327. doi: 10.1159/000045937
- 368- Hirawa N1, Uehara Y, Yamakado M, Toya Y, Gomi T, Ikeda T, Eguchi Y, Takagi M, Oda H, Seiki K, Urade Y, Umemura S. Lipocalin-type prostaglandin d synthase in essential hypertension. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2 Pt 2):449-54.
- 369- Mohri I, Taniike M, Okazaki I, Kagitani-Shimono K, Aritake K, Kanekiyo T, Yagi T, Takikita S, Kim HS, Urade Y, Suzuki K. Lipocalin-type prostaglandin D synthase is up-regulated in oligodendrocytes in lysosomal storage diseases and binds gangliosides. *J Neurochem*. 2006;97:641–651

- 370- Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzi RM, Uguccioni M, Facchini A. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:2165–2174.
- 371- Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 1999;5:698–701. doi: 10.1038/9550.
- 372- Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, Pisano B, Di Rosa M. Role of cyclopentenone prostaglandins in rat carrageenin pleurisy. *FEBS Lett.* 2001;508:61–66. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03035-6.
- 373- Kapoor M, Kojima F, Yang L, Crofford LJ. Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma during normal wound healing: a time course study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;76:103–112. doi: 10.1016/j.plefa.2006.11.006.
- 374- Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Ciabattoni G, Pini B, Cuccurullo C, Uchino S, Spigonardo F, De Luca M, Prontera C, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Balance between PGD synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1259–1265. doi: 10.1161/01.ATV.0000133192.39901.be.
- 375- Fournier T, Fadok V, Henson PM. Tumor necrosis factor-alpha inversely regulates prostaglandin D<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> production in murine macrophages. Synergistic action of cyclic AMP on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *J Biol Chem.* 1997;272:31065–31072. doi: 10.1074/jbc.272.49.31065.
- 376- Matsumoto H, Naraba H, Murakami M, Kudo I, Yamaki K, Ueno A, Oh-ishi S. Concordant induction of prostaglandin E<sub>2</sub> synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E<sub>2</sub> over thromboxane and prostaglandin D<sub>2</sub> in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;230:110–114. doi: 10.1006/bbrc.1996.5894.
- 377- Murakami Y, Akahoshi T, Hayashi I, Endo H, Hashimoto A, Kono S, Kondo H, Kawai S, Inoue M, Kitasato H. Inhibition of monosodium urate monohydrate crystal-induced acute inflammation by retrovirally transfected prostaglandin D synthase. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2931–2941. doi: 10.1002/art.11271
- 378- Jung SM, Schumacher HR, Kim H, Kim M, Lee SH, Pessler F. Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants: elevation of prostaglandin D<sub>2</sub> levels. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:R64. doi: 10.1186/ar2222.
- 379- Trivedi SG, Newson J, Rajakariar R, Jacques TS, Hannon R, Kanaoka Y, Eguchi N, Colville-Nash P, Gilroy DW. Essential role for hematopoietic prostaglandin D<sub>2</sub> synthase in the control of delayed type hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:5179–5184.



- 380- Jakob M, Demarteau O, Suetterlin R, Heberer M, Martin I. Chondrogenesis of expanded adult human articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:852–857
- 381- Relic B, Benoit V, Franchimont N, Ribbens C, Kaiser MJ, Gillet P, Merville MP, Bours V, Malaise MG. 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits Bay 11–7085-induced sustained extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and apoptosis in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *J Biol Chem.* 2004;279:22399–22403.
- 382- Stewart MD, Li J, Wong J. Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol.* 2005;25:2525–2538. doi: 10.1128/MCB.25.7.2525-2538.2005.
- 383- Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses on arthritis. An overview. *J Rheumatol.* 2002;29:3–14.
- 384- Kobayashi T, Notoya K, Naito T, Unno S, Nakamura A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum.* 2005;52:479–487. doi: 10.1002/art.20792.
- 385- Boileau C, Martel-Pelletier J, Fahmi H, Mineau F, Boily M, Pelletier JP. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone reduces the development of cartilage lesions in an experimental dog model of osteoarthritis: in vivo protective effects mediated through the inhibition of key signaling and catabolic pathways. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2288–2298.
- 386- Zayed N, Afif H, Chabane N, Mfuna-Endam L, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Motiani RK, Trebak M, Duval N, Fahmi H. Inhibition of interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinases 1 and 13 production in human osteoarthritic chondrocytes by prostaglandin D(2) *Arthritis Rheum.* 2008;58:3530–3540
- 387- Shah K, Zhao AG, Sumer H. New Approaches to Treat Osteoarthritis with Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2018;2018:5373294. Published 2018 Sep 16. doi:10.1155/2018/5373294
- 388- Arden N., Blanco F., Cooper C., et al. Atlas of Osteoarthritis. Springer Healthcare Limited; 2014.
- 389- Balmaceda C. M. Evolving guidelines in the use of topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2014;15(1) doi: 10.1186/1471-2474-15-27.
- 390- Nelson A. E., Allen K. D., Golightly Y. M., Goode A. P., Jordan J. M. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: the Chronic Osteoarthritis Management Initiative of the U.S. Bone and Joint Initiative. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 2014;43(6):701–712. doi: 10.1016/j.semarthrit.2013.11.012.

- 391- Craig D. G. N., Bates C. M., Davidson J. S., Martin K. G., Hayes P. C., Simpson K. J. Staggered overdose pattern and delay to hospital presentation are associated with adverse outcomes following paracetamol-induced hepatotoxicity. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2012;73(2):285–294. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.04067.x.
- 392- Machado G. C., Maher C. G., Ferreira P. H., et al. Efficacy and safety of paracetamol for spinal pain and osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *BMJ*. 2015;350, article h1225 doi: 10.1136/bmj.h1225.
- 393- Manheimer E., Cheng K., Linde K., et al. Acupuncture for peripheral joint osteoarthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010;(1) doi: 10.1002/14651858.cd001977.pub2.
- 394- Derry S., Moore R. A., Rabbie R. Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;(9) doi: 10.1002/14651858.CD007400.pub2
- 395- McAlindon T. E., Bannuru R. R., Sullivan M. C., et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2014;22(3):363–388. doi: 10.1016/j.joca.2014.01.003.
- 396- Dowell D., Haegerich T. M., Chou R. CDC guideline for prescribing opioids for chronic pain-United States, 2016. *JAMA*. 2016;315(15):1624–1645. doi: 10.1001/jama.2016.1464.
- 397- Cook J. L., Payne J. T. Surgical treatment of osteoarthritis. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*. 1997;27(4):931–944. doi: 10.1016/S0195-5616(97)50087-8.
- 398- Moseley J. B., O'Malley K., Petersen N. J., et al. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(2):81–88. doi: 10.1056/NEJMoa013259.
- 399- Zhang W., Moskowitz R. W., Nuki G., et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16(2):137–162. doi: 10.1016/j.joca.2007.12.013.
- 400- Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation-technique and long-term follow-up. *Injury*. 2008;39(1):40–49. doi: 10.1016/j.injury.2008.01.040.
- 401- Jakobsen R. B., Engebretsen L., Slauterbeck J. R. An analysis of the quality of cartilage repair studies. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2005;87(10):2232–2239. doi: 10.2106/jbjs.d.02904.
- 402- Steadman J. R., Rodkey W. G., Briggs K. K., Rodrigo J. J. The microfracture technique to treat full thickness articular cartilage defects of the knee. *Der Orthopäde*. 1999;28(1):26–32. doi: 10.1007/pl00003545.
- 403- Mithoefer K., McAdams T., Williams R. J., Kreuz P. C., Mandelbaum B. R. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee an

- evidence-based systematic analysis. *American Journal of Sports Medicine*. 2009;37(10):2053–2063. doi: 10.1177/0363546508328414.
- 404- Hunziker E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002;10(6):432–463. doi: 10.1053/joca.2002.0801.
- 405- Egg D. Concentrations of prostaglandins D2, E2, F2 alpha, 6-keto-F1 alpha and thromboxane B2 in synovial fluid from patients with inflammatory joint disorders and osteoarthritis. *Z Rheumatol*. 1984;43:89–96.
- 406- Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Nishioka K. A potential role of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *J Biol Chem*. 2004
- 407- Gallant MA, Samadfam R, Hackett JA, Antoniou J, Parent JL, de Brum-Fernandes AJ. Production of prostaglandin D(2) by human osteoblasts and modulation of osteoprotegerin, RANKL, and cellular migration by DP and CRTH2 receptors. *J Bone Miner Res*. 2005;20:672–81.
- 408- Pietila P, Moilanen E, Seppala E, Nissila M, Lepisto P, Laitinen O, Vapaatalo H. Differences in the production of arachidonic acid metabolites between healthy and rheumatic synovial fibroblasts in vitro. A preliminary study. *Scand J Rheumatol*. 1984;13:243–6.
- 409- De Paulis A, Marino I, Ciccarelli A, de Crescenzo G, Concardi M, Verga L, Arbustini E, Marone G. Human synovial mast cells. I. Ultrastructural in situ and in vitro immunologic characterization. *Arthritis Rheum*. 1996;39:1222–33.
- 410- Relic B, Benoit V, Franchimont N, Ribbens C, Kaiser MJ, Gillet P, Merville MP, Bours V, Malaise MG. 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 inhibits Bay 11-7085-induced sustained extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and apoptosis in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004;279:22399–403.
- 411- Jakob M, Demartean O, Suetterlin R, Heberer M, Martin I. Chondrogenesis of expanded adult human articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:852–7.
- 412- Tasaki Y, Takamori R, Koshihara Y. Prostaglandin D2 metabolite stimulates collagen synthesis by human osteoblasts during calcification. *Prostaglandins*. 1991;41:303–13.
- 413- Kapoor M, Kojima F, Yang L, Crofford LJ. Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma during normal wound healing: a time course study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007;76:103–12.
- 414- Hirata M, Kakizuka A, Aizawa M, Ushikubi F, Narumiya S. Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:11192–11196.

- 415- Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med*. 2001;193:255–261.
- 416- Eguchi Y, Eguchi N, Oda H, Seiki K, Kijima Y, Matsu-ura Y, Urade Y, Hayaishi O. Expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in human heart and its accumulation in the coronary circulation of angina patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:14689–14694.
- 417- Kagitani-Shimono K, Mohri I, Oda H, Ozono K, Suzuki K, Urade Y, Taniike M. Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is upregulated in the alphaB-crystallin-positive oligodendrocytes and astrocytes in the chronic multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006;32:64–73. doi: 10.1111/j.1365-2990.2005.00690.x.
- 418- Hirawa N, Uehara Y, Ikeda T, Gomi T, Hamano K, Totsuka Y, Yamakado M, Takagi M, Eguchi N, Oda H, Seiki K, Nakajima H, Urade Y. Urinary prostaglandin D synthase (beta-trace) excretion increases in the early stage of diabetes mellitus. *Nephron*. 2001;87:321–327. doi: 10.1159/000045937.
- 419- Hirawa N, Uehara Y, Yamakado M, Toya Y, Gomi T, Ikeda T, Eguchi Y, Takagi M, Oda H, Seiki K, Urade Y, Umemura S. Lipocalin-type prostaglandin d synthase in essential hypertension. *Hypertension*. 2002;39:449–454. doi: 10.1161/hy0202.102835.
- 420- Mohri I, Taniike M, Okazaki I, Kagitani-Shimono K, Aritake K, Kanekiyo T, Yagi T, Takikita S, Kim HS, Urade Y, Suzuki K. Lipocalin-type prostaglandin D synthase is up-regulated in oligodendrocytes in lysosomal storage diseases and binds gangliosides. *J Neurochem*. 2006;97:641–651. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03753.x.
- 421- Van den Brule S, Huaux F, Uwambayinema F, Ibouaaden S, Yakoub Y, Palmi-Pallag M, et al. Lung inflammation and thymic atrophy after bleomycin are controlled by the prostaglandin D2 receptor DP1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:212–22.
- 422- Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, et al. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 2001;193:255–61.
- 423- Nebbaki SS, El Mansouri FE, Afif H, Kapoor M, Benderdour M, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Fahmi H: Expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha, beta, gamma, and H- and L-prostaglandin D synthase during osteoarthritis in the spontaneous hartley guinea pig and experimental dog models. *J Rheumatol* 2013, 40(6):877-890.

- 424- Maicas N, Ibanez L, Alcaraz MJ, Ubeda A, Ferrandiz ML: Prostaglandin D2 regulates joint inflammation and destruction in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2012, 64(1):130-140.
- 425- Cuzzocrea S, Wayman NS, Mazzon E, Dugo L, Di Paola R, Serraino I, Britti D, Chatterjee PK, Caputi AP, Thiemermann C: The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Mol Pharmacol* 2002, 61(5):997-1007
- 426- Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H: 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 2000, 106(2):189-197.
- 427- Angeli V, Staumont D, Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P, Pichavant M, Lambrecht BN, Capron M, Dombrowicz D, Trottein F: Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol* 2004, 172(6):3822-3829.
- 428- Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL: Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 279(1):G238-244.
- 429- Ragolia L, Palaia T, Hall CE, Maesaka JK, Eguchi N, Urade Y: Accelerated glucose intolerance, nephropathy, and atherosclerosis in prostaglandin D2 synthase knock-out mice. *J Biol Chem* 2005, 280(33):29946-29955.
- 430- Joo M, Kwon M, Sadikot RT, Kingsley PJ, Marnett LJ, Blackwell TS, Peebles RSJ, Urade Y, Christman JW: Induction and function of lipocalin prostaglandin D synthase in host immunity. *J Immunol* 2007, 179(4):2565-2575.
- 431- Gallant MA, Samadfam R, Hackett JA, Antoniou J, Parent JL, de Brum-Fernandes AJ: Production of prostaglandin D(2) by human osteoblasts and modulation of osteoprotegerin, RANKL, and cellular migration by DP and CRTH2 receptors. *J Bone Miner Res* 2005, 20(4):672-681.
- 432- Tanaka T, Urade Y, Kimura H, Eguchi N, Nishikawa A, Hayaishi O: Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J Biol Chem* 1997, 272(25):15789-15795.
- 433- Beuckmann CT, Gordon WC, Kanaoka Y, Eguchi N, Marcheselli VL, Gerashchenko DY, Urade Y, Hayaishi O, Bazan NG: Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is located in pigment epithelial cells of rat retina and accumulates within interphotoreceptor matrix. *J Neurosci* 1996, 16(19):6119-6124.
- 434- Mohri I, Taniike M, Okazaki I, Kagitani-Shimono K, Aritake K, Kanekiyo T, Yagi T, Takikita S, Kim HS, Urade Y et al: Lipocalin-type prostaglandin D synthase is up-regulated in oligodendrocytes in lysosomal storage diseases and binds gangliosides. *J Neurochem* 2006, 97(3):641-651.

- 435- Minami T, Okuda-Ashitaka E, Mori H, Ito S, Hayaishi O: Prostaglandin D2 inhibits prostaglandin E2-induced allodynia in conscious mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 278(3):1146-1152.
- 436- Minami T, Okuda-Ashitaka E, Nishizawa M, Mori H, Ito S: Inhibition of nociceptin-induced allodynia in conscious mice by prostaglandin D2. *Br J Pharmacol* 1997, 122(4):605-610.
- 437- Telleria-Diaz A, Ebersberger A, Vasquez E, Schache F, Kahlenbach J, Schaible HG: Different effects of spinally applied prostaglandin D2 on responses of dorsal horn neurons with knee input in normal rats and in rats with acute knee inflammation. *Neuroscience* 2008, 156(1):184-192.
- 438- Eguchi N, Minami T, Shirafuji N, Kanaoka Y, Tanaka T, Nagata A, Yoshida N, Urade Y, Ito S, Hayaishi O: Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(2):726-730.
- 439- Minami T, Uda R, Horiguchi S, Ito S, Hyodo M, Hayaishi O: Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin E2 to conscious mice. *Pain* 1994, 57(2):217-223
- 440- Yamamoto Y, Otani S, Hirai H, Nagata K, Aritake K, Urade Y, et al. Dual functions of prostaglandin D2 in murine contact hypersensitivity via DP and CRTH2. *Am J Pathol* 2011;179:302–14.
- 441- Hammad H, Kool M, Soullie T, Narumiya S, Trottein F, Hoogsteden HC, et al. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. *J Exp Med* 2007;204:357–67.
- 442- Van den Brule S, Huaux F, Uwambayinema F, Ibouaaden S, Yakoub Y, Palmi-Pallag M, et al. Lung inflammation and thymic atrophy after bleomycin are controlled by the prostaglandin D2 receptor DP1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:212–22.
- 443- An den Brule S, Wallemme L, Uwambayinema F, Huaux F, Lison D. The D prostanoid receptor agonist BW245C. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335:472–9.
- 444- Angeli V, Staumont D, Charbonnier AS, Hammad H, Gosset P, Pichavant M, et al. Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol* 2004;172:3822–9.
- 445- Maicas N, Ibanez L, Alcaraz MJ, Ubeda A, Ferrandiz ML. Prostaglandin D2 regulates joint inflammation and destruction in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:130–40.
- 446- Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:390–8.
- 447- Tesch AM, MacDonald MH, Kollias-Baker C, Benton HP. Chondrocytes respond to adenosine via A2 receptors and activity is potentiated by an adenosine deaminase inhibitor and a phosphodiesterase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:34–43.

- 448- Sato T, Konomi K, Fujii R, Aono H, Aratani S, Yagishita N, et al. Prostaglandin EP2 receptor signalling inhibits the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2011;70:221–6.
- 449- Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., McMaster S., Sawatzky D.A., Willoughby D.A., Lawrence T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J.* 2003;17(15):2269–2271
- 450- Fahmi H., Pelletier J.P., Mineau F., Martel-Pelletier J. 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(11):845–848.
- 451- Silva Quinteiro M., Henrique Napimoga M., Gomes Macedo C., et al. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;740:58–65.
- 452- Buckley C.D., Gilroy D.W., Serhan C.N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity.* 2014;40(3):315–327.
- 453- Bar-Or D, Rael LT, Thomas GW, Brody EN. Inflammatory Pathways in Knee Osteoarthritis: Potential Targets for Treatment. *Curr Rheumatol Rev.* 2015;11(1):50-58.
- 454- Hirata Y., Hayashi H., Ito S., et al. Occurrence of 9-deoxy-delta 9,delta 12-13,14-dihydroprostaglandin D2 in human urine. *J. Biol. Chem.* 1988;263(32):16619–16625.
- 455- Siddhivarn C., Banes A., Champagne C., Riche E.L., Weerapradist W., Offenbacher S. Prostaglandin D2 pathway and peroxisome proliferator-activated receptor gamma-1 expression are induced by mechanical loading in an osteoblastic cell line. *J. Periodontal Res.* 2006;41(2):92–100.
- 456- Shibata T., Kondo M., Osawa T., Shibata N., Kobayashi M., Uchida K. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J. Biol. Chem.* 2002;277(12):10459–10466.
- 457- Bar-Or D., Salottolo K.M., Loose H., et al. A randomized clinical trial to evaluate two doses of an intra-articular injection of LMWF-5A in adults with pain due to osteoarthritis of the knee. *PLoS One.* 2014;9(2):e87910.
- 458- Afif H., Benderdour M., Mfuna-Endam L., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 expression is diminished in human osteoarthritic cartilage and is downregulated by interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 2007;9(2):R31.
- 459- Forman B.M., Tontonoz P., Chen J., Brun R.P., Spiegelman B.M., Evans R.M. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995;83(5):803–812.
- 460- Kliewer S.A., Lenhard J.M., Willson T.M., Patel I., Morris D.C., Lehmann J.M. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 1995;83(5):813–819.

- 461- Fahmi H., Di Battista J.A., Pelletier J.P., Mineau F., Ranger P., Martel-Pelletier J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2001;44(3):595–607.
- 462- Bianchi A., Moulin D., Sebillaud S., et al. Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14prostaglandin J2. *Arthritis Res. Ther.* 2005;7(6):R1325–R1337.
- 463- Moulin D., Poleni P.E., Kirchmeyer M., et al. Effect of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)gamma agonists on prostaglandins cascade in joint cells. *Biorheology.* 2006;43(3-4):561–575.
- 464- Rossi A., Kapahi P., Natoli G., et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase. *Nature.* 2000;403(6765):103–108.
- 465- Straus D.S., Pascual G., Li M., et al. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(9):4844–4849.
- 466- Lin T.H., Tang C.H., Wu K., Fong Y.C., Yang R.S., Fu W.M. 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin-J2 and ciglitazone inhibit TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase 13 production via the antagonism of NF-kappaB activation in human synovial fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 2011;226(12):3242–3250.
- 467- Alves C., de Melo N., Fraceto L., de Araujo D., Napimoga M. Effects of 15d-PGJ(2)-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 2011;162(3):623–632.