

Université de Montréal

Régulation de l'expression de PPAR γ dans l'arthrose

par

Salwa Sarah NEBBAKI

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D
en Pharmacologie

Juin, 2015

© Salwa Sarah NEBBAKI, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :
Régulation de l'expression de PPAR γ
dans l'arthrose

Présentée par :
Salwa Sarah NEBBAKI

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-François Gauchat, président-rapporteur
Dr Hassan Fahmi, directeur de recherche
Dr Mohamed Benderdour, co-directeur
Dre Nathalie Grandvaux, membre du jury
Dr Ahmed Chraïbi, examinateur externe
Dr Richard Bertrand, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'arthrose (OA) est une maladie dégénérative très répandue touchant les articulations. Elle est caractérisée par la destruction progressive du cartilage articulaire, l'inflammation de la membrane synoviale et le remodelage de l'os sous chondral. L'étiologie de cette maladie n'est pas encore bien définie. Plusieurs études ont été menées pour élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de l'OA.

Les effets protecteurs du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma (PPAR γ) dans l'OA sont bien documentés. Il a été démontré que PPAR γ possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-cataboliques. Aussi, plusieurs stimuli ont été impliqués dans la régulation de l'expression de PPAR γ dans différents types cellulaires. Cependant, les mécanismes exacts responsables de cette régulation ainsi que le profil de l'expression de ce récepteur au cours de la progression de l'OA ne sont pas bien connus.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons essayé d'élucider les mécanismes impliqués dans l'altération de l'expression de PPAR γ dans cette maladie. Nos résultats ont confirmé l'implication de l'interleukine-1 β (IL-1 β), une cytokine pro-inflammatoire, dans la réduction de l'expression de PPAR γ au niveau des chondrocytes du cartilage articulaire. Cet effet coïncide avec l'induction de l'expression du facteur de transcription à réponse précoce de type 1 (Egr-1). En plus, la diminution de l'expression de PPAR γ a été associée au recrutement d'Egr-1 et la réduction concomitante de la liaison de Sp1 au niveau du promoteur de PPAR γ .

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons évalué le profil d'expression de ce récepteur dans le cartilage au cours de la progression de cette maladie. Le cochon d'inde avec OA spontanée et le chien avec OA induite par rupture du ligament croisé antérieur (ACLT) deux modèles animaux d'OA ont été utilisés pour suivre l'expression des trois isoformes de PPARs : PPAR alpha (α), PPAR bêta (β) et PPAR gamma (γ) ainsi que la prostaglandine D synthase hématopoïétique (H-PGDS) et la prostaglandine D synthase de type lipocaline (L-PGDS) deux enzymes impliquées dans la production de l'agoniste naturel de PPAR γ , la 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandine J(2) (15d-PGJ2).

Nos résultats ont démontré des changements dans l'expression de PPAR γ et la L-PGDS. En revanche, l'expression de PPAR α , PPAR β et H-PGDS est restée stable au fil du temps. La diminution de l'expression de PPAR γ dans le cartilage articulaire semble contribuer au développement de l'OA dans les deux modèles animaux. En effet, le traitement des chondrocytes par de siRNA dirigé contre PPAR γ a favorisé la production des médiateurs arthrosiques tels que l'oxyde nitrique (NO) et la métalloprotéase matricielle de type 13 (MMP-13), confirmant ainsi le rôle anti-arthrosique de ce récepteur. Contrairement à ce dernier, le niveau d'expression de la L-PGDS a augmenté au cours de la progression de cette maladie. La surexpression de la L-PGDS au niveau des chondrocytes humains a été associée à la diminution de la production de ces médiateurs arthrosiques, suggérant son implication dans un processus de tentative de réparation.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la modulation du niveau d'expression de PPAR γ , de la L-PGDS et d'Egr-1 au niveau du cartilage articulaire pourrait constituer une voie thérapeutique potentielle dans le traitement de l'OA et probablement d'autres formes d'arthrite.

Mots clés: Arthrose, cartilage, PPARs, PGDS, Egr-1, Sp1, chondrocytes

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative joint disease. It is characterised by progressive destruction of articular cartilage, synovial inflammation and subchondral bone remodelling. The complete etiology of OA is still not well defined. Several studies have been carried out to elucidate the molecular and cellular mechanisms involved in OA development.

The protective effects of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in OA have been well documented. It has been demonstrated that PPAR γ exhibit anti-inflammatory and anti-catabolic properties. Although many stimuli have been reported to regulate the expression of PPAR γ in several cell types. However, little information is available on the exact mechanisms that govern its regulation as well as the expression profile of this receptor during the course of the disease.

In the first part of this work, we tried to elucidate the mechanisms involved in the alteration of PPAR γ expression in OA. Our findings confirm that interleukin-1 beta (IL-1 β), a proinflammatory cytokine, down regulate the expression of PPAR γ in articular chondrocytes. This effect coincided with the induction of early growth response protein-1 (Egr-1) expression. In addition, down regulation of PPAR γ expression was associated with Egr-1 recruitment to and concomitant reduction in Sp1 occupancy at PPAR γ promoter.

In the second part of this work, we evaluated the expression profile of this receptor in cartilage during the progression of OA. Spontaneous Hartley guinea pig model and anterior cruciate ligament transection (ACLT) dog model were used to follow the expression of three isoforms of PPARs: PPAR alpha (α), PPAR beta (β) and PPAR gamma (γ) as well as hematopoietic prostaglandin D synthase (H-PGDS) and lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) two enzymes involved in the production of the natural agonist PPAR γ , 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) (15d PGJ2).

Our results showed changes in the expression of PPAR γ and L-PGDS. In contrast, the level of PPAR α , PPAR β and H-PGDS was constant over time. The decrease in PPAR γ levels in articular chondrocytes suggest that it may be a contributing factor in OA development in both animal models used in this study. Furthermore, siRNA silencing of PPAR γ resulted in an

enhanced production of osteoarthric mediators such as matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) and nitric oxide (NO). Thus, confirming the anti-arthritic role of this receptor. In contrast, unlike the later, there was an increase in the expression level of L-PGDS during disease progression. The overexpression of L-PGDS in human chondrocytes was associated with reduced production of these osteoarthric mediators, suggesting its involvement in repair process.

In summary, our data suggest that the modulation of PPAR γ , L-PGDS and Egr-1 expression levels in articular cartilage may be a potential therapeutic approach in the treatment of OA and probably other forms of arthritis.

Keys words: Osteoarthritis, cartilage, PPARs, PGDS, Egr-1, Sp1, chondrocytes

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	v
TABLE DES MATIÈRE.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
DÉDICACE.....	xxi
REMERCIEMENTS.....	xxii
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
I.A Arthrose.....	1
I.A.1 Généralité sur l’arthrose.....	1
I.A.2 Articulations ciblées par l’arthrose.....	1
I.A.3 Types d’arthrose.....	2
I.A.4 Prévalence de l’arthrose.....	2
I.A.4.1 La gonarthrose.....	3
I.A.4.2 La coxarthrose.....	4
I.A.4.3 Arthrose de la main.....	4
I.A.5 Facteurs de risque.....	6
I.A.5.1 Facteurs de risque systémiques.....	6
I.A.5.1.1 Âge.....	6
I.A.5.1.2 Sexe et hormones.....	6
I.A.5.1.3 Race et prédisposition génétique.....	8
I.A.5.1.4 Alimentation.....	9

I.A.5.2 Facteurs de risque mécaniques locaux.....	9
I.A.5.2.1 Obésité.....	9
I.A.5.2.2 Mode de vie.....	11
I.A.5.2.3 Traumatismes articulaires.....	12
I.A.6 Symptômes et diagnostic de l'arthrose.....	13
I.A.7 Traitements de l'arthrose.....	15
I.A.8 Impact socio-économique de l'arthrose.....	16
I.B Articulation du genou.....	17
I.B.1 Structure de l'articulation du genou.....	17
I.B.2 Composition de l'articulation du genou.....	18
I.B.2.1 Cartilage articulaire.....	18
I.B.2.1.1 Composition du cartilage articulaire.....	20
I.B.2.1.1.1 Chondrocytes.....	20
I.B.2.1.1.2 Eau.....	21
I.B.2.1.1.3 Collagène.....	21
I.B.2.1.1.4 Protéoglycanes.....	22
I.B.2.1.2 Nutrition du cartilage articulaire.....	23
I.B.2.2 Ménisques.....	24
I.B.2.3 Membrane synovial.....	26
I.B.2.4 Ligaments.....	27
I.B.2.5 Tissu osseux.....	28
I.B.2.5.1 Organisation du tissu osseux.....	28
I.B.2.5.2 Os sous-chondral.....	29
I.C Physiopathologie de l'arthrose.....	29
I.C.1 Structures affectées par l'arthrose.....	29
I.C.1.1 Cartilage arthrosique.....	30
I.C.1.1.1 Déséquilibre de l'homéostasie du cartilage.....	31
I.C.1.1.2 Dégradation du cartilage.....	32
I.C.1.2 Inflammation de la membrane synoviale.....	33
I.C.1.3 Remodelage osseux.....	34

I.C.1.3.1 Changements structuraux osseux.....	34
I.C.1.3.2 Altérations métaboliques osseuses.....	36
I.C.2 Médiateurs impliqués dans l'arthrose.....	37
I.C.2.1 Facteurs cataboliques.....	37
I.C.2.1.1 Métalloprotéases (MMPs).....	37
I.C.2.1.2 ADAMTs.....	41
I.C.2.1.3 Protéases à sérine.....	42
I.C.2.1.4 Protéases à cystéine.....	42
I.C.2.2 Facteurs anaboliques.....	43
I.C.2.3 Médiateurs pro-inflammatoires.....	47
I.C.2.2.1 Cytokines.....	48
I.C.2.2.2 Oxyde nitrique (NO).....	55
I.C.2.4 Eicosanoïdes.....	56
I.C.2.4.1 Phospholipase A2 (PLA2).....	56
I.C.2.4.2 Cyclo-oxygénases.....	57
I.C.2.4.3 Prostanoïdes.....	58
I.C.2.4.3.1 Prostaglandine E 2 (PGE2).....	58
I.C.2.4.3.2 Prostaglandine D 2 (PGE2).....	61
I.C.2.4.3.3 Autres prostanoïdes.....	64
I.C.2.5 Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs).....	65
I.C.2.5.1 Structure des PPARs.....	65
I.C.2.5.2 Distribution tissulaire des PPARs.....	67
I.C.2.5.3 Ligands des PPARs.....	68
I.C.2.5.4 Mode d'action des PPARs.....	70
I.C.2.5.5 Activité transcriptionnelle des PPARs.....	72
I.C.2.5.5 Rôle de PPAR γ dans l'arthrose.....	73
I.C.2.6 Gènes à réponse précoce.....	74
I.C.2.6.1 Structure d'Egr-1.....	75
I.C.2.6.2 Élément régulateurs d'Egr-1.....	75

I.C.2.6.3 Rôle biologique d'Egr-1.....	77
I.D Modèles d'arthrose expérimentale.....	78
I.D.1 Modèles d'arthrose spontanée.....	79
I.D.2 Modèles d'arthrose induite.....	80
CHAPITRE II: TRAVAUX RÉALISÉS.....	83
Article I.....	85
Article II.....	116
CHAPITRE III: DISCUSSION.....	152
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	172
BIBLIOGRAPHIE.....	174

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Prévalence de l'arthrose des genoux dans différentes activités sportives.....	14
Tableau 2: Classification des MMPs.....	40
Tableau 3: Tableau récapitulatif des principales cytokines impliquées dans la maladie d'arthrose.....	54
Tableau 4: Les différents ligands naturels et synthétiques des PPARs.....	70

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1: Incidence de l'arthrose du genou, la hanche et la main chez les membres de la Fallon Community Health Plan.....	5
Figure 2: Structure d'une articulation du genou.....	18
Figure 3: Structure des différentes couches du cartilage articulaire.....	20
Figure 4: Propriétés mécaniques des fibrilles de collagène.....	22
Figure 5: Organisation de la jonction ostéochondrale du cartilage articulaire.....	24
Figure 6: Structures articulaires touchées au cours de la maladie d'arthrose.....	30
Figure 7: Étape de l'évolution de l'arthrose au niveau du genou.....	31
Figure 8: Médiateurs impliqués dans le développement de l'arthrose.....	48
Figure 9: Mécanismes d'action de l'IL-1 β au niveau du cartilage arthrosique.....	51
Figure 10: Biosynthèse des eicosanoïdes.....	56
Figure 11: Les différents isoformes de PPAR γ	66
Figure 12: Expression tissulaire de PPAR α , β et γ	68
Figure 13: Mécanisme d'action de PPAR γ	72
Figure 14: Les éléments régulateurs d'Egr-1.....	76

Chapitre II

Article 1:

Figure 1: IL-1-mediated downregulation of PPAR γ mRNA expression requires de novo protein synthesis.....	110
Figure 2: Effect of IL-1 on Egr-1 and Sp1 expression in osteoarthritis chondrocytes.....	111

Figure 3: Effect of IL-1 on the recruitment of Egr-1 and Sp1 at the PPAR γ promoter.....	112
Figure 4: Effect of Sp1 and Egr-1 on PPAR γ promoter activity.....	113
Figure 5: Egr-1 is required for IL-1-mediated suppression of PPAR γ expression....	114
Figure 6: Expression of Egr-1 in normal and OA cartilage.....	115

Article 2:

Figure 1: PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ expression during the course of osteoarthritis (OA) in the Hartley guinea pig model.....	141
Figure 2: PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ expression in cartilage during the progression of osteoarthritis (OA) in the ACLT dog model.....	142
Figure 3: PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ mRNA expression during the course of osteoarthritis (OA) in the Hartley guinea pig model.....	143
Figure 4: Expression of H-PGDS and L-PGDS during the course of osteoarthritis (OA) in the Hartley guinea pig model.....	144
Figure 5: H-PGDS and L-PGDS mRNA expression during the course of OA in the Hartley guinea pig model.....	145
Figure 6: PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ mRNA expression during the course of osteoarthritis in the ACLT dog model.....	146
Figure 7: Expression of H-PGDS and L-PGDS in cartilage during the course of osteoarthritis in the ACLT dog model.....	147
Figure 8: H-PGDS and L-PGDS mRNA expression in cartilage during progression of osteoarthritis in the ACLT dog model.....	148
Figure 9: Correlation between levels of PPAR- γ and L-PGDS and histologic grade of osteoarthritis (OA) in the Hartley guinea pig and the ACLT dog model.....	149
Figure 10: PPAR- γ silencing enhanced basal and IL-1-induced production of NO and MMP-13 in human chondrocytes.....	150

Figure 11: L-PGDS overexpression decreased basal and IL-1-induced production of NO and MMP-13 in human chondrocytes..... 151

Chapitre III

Figure 15: Mécanismes de régulation de l'expression d'Egr-1 par l'IL-1 β 160

Figure 16: Mécanismes de répression de l'expression de PPAR γ dans le cartilage arthrosique 165

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AVI	Années vécues avec l'incapacité
ACL	Ligament croisé antérieur
ACLT	Rupture du 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 ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
COX	Cyclo-oxygénase
cPGES	Cytosolic PGE synthase
CRE	Éléments de réponse à l'AMPc
CREB	cAMP response element-binding protein

CRTH2	Récepteur chimiotactique exprimée sur Th2
DP1	Récepteur D prostanöide
DBD	Domaine de fixation à l'ADN
DAG	Diacyl glycérol
E2	Estradiol
EBE	Egr-1 binding element
EBS	Egr-1 binding site
Egr-1	Early growth response 1 protein
EIK1	Ets-like gene 1
EP	Récepteur de la PGE2
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FGFs	Facteurs de croissance fibroblastiques
FGFR	Récepteurs de FGF
FGFR	Récepteurs de FGF
Gi	Protéine G inhibitrice
Gs	Protéine G stimulatrice
GDF5	Facteur de croissance de différenciation
gp130	Glycoprotéine 130
mgp130	Glycoprotéine membranaire 130
H-PGDS	Prostaglandine D synthase hématopoïétique
HDAC	Histones désacétylases
HODE	Acide hydroxyoctadécanoïque
IL	Interleukine

IL-1R	Récepteurs de l'interleukine 1
IL-1Ra	Antagoniste du récepteur de l'IL-1 β
ICE	Enzyme de conversion de l'IL-1 β
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 inducible
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LBD	Domaine de liaison au ligand
L-PGDS	Prostaglandine D synthase de type lipocaline
LTB4	Leucotriène B4
MAP kinases	Mitogen-activated protein kinases
MEK	MAPK/ERK kinase
MEKK1	Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1
MSK	Mitogen and stress-activated protein kinase
MMPs	Métalloprotéases matricielles
mIL-6R	Récepteur membranaire d'IL-6

MIA	Monosodium IodoAcetate
mPGES-1	Microsomal PGE synthase-1
NAB	NGFIA (Egr-1)-binding protein
NHANES III	3ème National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOS1	NOS neuronale
NOS3	NOS endothéliale
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NDRG1	Gène 1 régulé en aval par N-myc
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
OA	Arthrose
OPG	Ostéoprotégérine
OPGL	ligand de l'ostéoprotégérine
PA	Activateurs du plasminogène
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur de plasminogène de type I
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGs	Prostaglandines
PGI ₂	Prostacycline
PPARs	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PPAR α	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes alpha
PPAR β	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes béta
PPAR γ	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma

PPRE	Peroxisome proliferator-activated receptor response elements
PKC	Protéine kinase C
PKA	Protéine kinase A
PI-9	Protéase inhibitrice 9
PLA2c	Phospholipase A2 cytosolique
PIP2	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
RVD	Récepteur de la vitamine D
RE α	Récepteur d'œstrogène alpha
RE β	Récepteur d'œstrogène bêta
Ref1	Redox effector factor-1
RsK	Ribosomal <i>s6 kinase</i>
RXR	Retinoid X Receptor
SAPK	Stress-activated protein kinase
Sap	Secreted Aspartyl Proteinase
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
Sp1	Specificity protein 1
SRE	Éléments de réponse au sérum
SRF	Facteur de réponse au sérum

sgp130	Glycoprotéine soluble 130
sIL-6R	Récepteur soluble de l'IL6
sTAF	TBP associated factor
TGF- β	Facteur de croissance transformants béta
TIMPs	Inhibiteurs des métalloprotéinases
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TNF-R	Récepteur du facteur de nécrose tumorale
TPA	Tétradécanoylphorbol-acétate
TCF	Facteurs de complexe ternaire
TFIID	TATA binding protein (TBP) and TBP associated factors (TAFs)
TRE	TPA response element
TX	Thromboxane
TBPs	TATAbinding proteins
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
YY1	Facteur de transcription activateur
3D	Trois dimensions
8-(S)-(HETE)	8-(S)-hydroxyeicosatétraénoïque
δ 12-PGJ2	Delta-12-prostaglandine J2
15d-PGJ2	15-déoxy-D-12,14-prostaglandine J2

Je dédie cette thèse:

À mes parents,

Pour votre soutien tout au long de mon parcours scolaire,

À ma sœur et mes deux frères,

Pour votre écoute et vos encouragements constants,

À Saïd Irsalane,

Pour ta présence, ton aide et ta bonne humeur

À toute ma famille,

À tous mes amis.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Dr Hassan Fahmi, de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour réaliser cette thèse. Je le remercie également pour sa disponibilité, ses précieux conseils scientifiques et son encouragement permanent.

Je remercie mon co-directeur de recherche Dr Mohamed Benderdour pour ses conseils, sa collaboration et son encouragement.

Je tiens à remercier aussi les directeurs de l'Unité de recherche en arthrose (Ura), Pr Johanne Martel-Pelletier et Pr Jean-Pierre Pelletier, de m'avoir accepté dans l'unité durant mes études doctorales, pour leur support et soutien.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de jury, Dre Nathalie Grandvaux, Dr François Gauchat, Dr Ahmed Chraïbi et Dr Richard Bertrand pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je remercie les membres du laboratoire de Dr Fahmi: Hassan Afif, Fatima, Moustafa et Yassine.

Mes remerciements vont de même à tous les membres de l'unité de l'Ura. En particulier, Dr Daniel Lajeunesse pour ses conseils et sa disponibilité. Je remercie également Elie, David, François Mineau, Frédéric pour avoir répondu à toutes mes questions ainsi que les secrétaires Santa, Virginia et Lise pour leur aide et gentillesse.

Enfin, je tiens à remercier la FESP pour l'aide financière qu'elle m'a accordé au cours de la préparation de ma thèse.

CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.A Arthrose

I.A.1 Généralité sur l'arthrose

L'arthrose (OA) est la maladie articulaire la plus fréquente dans le monde (Arden et Nevitt, 2006). Elle est caractérisée par la destruction du cartilage articulaire, l'inflammation de la membrane synoviale et le remodelage de l'os sous chondral (Goldring, 2012; Burr et Gallant, 2012). L'ensemble de ces événements résultent d'une production excessive des médiateurs inflammatoires et cataboliques (Goldring et Goldring, 2007). L'OA est aussi associée à des perturbations fonctionnelles affectant la démarche et la mobilité (Mundermann et al., 2005; Steultjens et al., 2000). Ces changements touchent souvent le bien-être des patients, et se manifestent par une limitation des activités sociales et physiques habituelles, entraînant un handicap au quotidien des personnes malades (Car, 1999).

Les os des articulations en contact sont recouverts par une couche lisse de cartilage hyalin (Craig et al., 1990). La matrice du cartilage articulaire est constituée essentiellement du collagène de type II et des protéoglycanes (Poole et al., 2002). Au cours de l'OA, un déséquilibre dans l'homéostasie du cartilage est observé (Lee et al., 2013). En effet, les cellules chondrocytaires, le seul type cellulaire dans le cartilage participent à la dégradation de ses constituants par la production anormale des enzymes protéolytiques, des cytokines pro-inflammatoires et aussi différents médiateurs chimiques qui sont des produits du métabolisme des eicosanoïdes (Sokolove et Lepus, 2013; Loeser, 2006).

I.A.2 Articulations ciblées par l'arthrose

Contrairement à d'autres formes d'arthrite, l'OA touche spécifiquement les articulations (Loeser et al., 2012). Dans le corps humain, plusieurs sites articulaires sont le siège de développement de cette maladie. L'OA attaque principalement les articulations qui supportent le poids corporel comme celles des genoux, des hanches, de la colonne vertébrale et aussi celles des mains. À moindre degré, elle touche les petites articulations des pieds, des coudes,

des épaules, des poignets et des chevilles (Pertersson et al., 2002; Dieppe et Kirwan, 1994). Généralement, l'OA qui touche les articulations non portantes serait à l'origine d'une anomalie anatomique, des séquelles d'un traumatisme important, cela peut être le cas d'une fracture osseuse ou bien des traumatismes répétitifs, par exemple lors d'une activité professionnelle particulière (Rosignoll et al., 2005; Felson, 2004).

I.A.3 Types d'arthrose

L'OA est subdivisée traditionnellement en deux groupes étiologiques différents: l'OA primaire et l'OA secondaire.

L'origine de l'OA primaire n'est pas bien connue. Les personnes qui développent cette catégorie d'OA n'ont pas une prédisposition particulière et ignorent la cause (Hoaglund et al., 2001). Généralement, l'OA primaire est liée à l'âge. Elle est due au processus naturel de vieillissement qui rend le cartilage articulaire fragile et donc facile à se dégénérer (Aigner et al., 2004). Dans la majorité des cas, elle touche les articulations des genoux, des hanches et des mains (Swärd et al., 2010; Carroll, 2006).

L'OA secondaire apparaît souvent lors d'une prédisposition à des maladies inflammatoires, métaboliques ou bien suite à des traumatismes articulaires antérieurs et des fractures osseuses (Manidakis et al., 2010; Tey et al., 2006). Ces événements altèrent la structure articulaire et perturbent le fonctionnement normal du cartilage hyalin (Lotz et al., 2010; Ziskoven et al., 2010).

I.A.4 Prévalence de l'arthrose

Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées dont le but d'étudier la prévalence et la distribution de cette pathologie. Ces études se distinguent par les caractéristiques de la population étudiée, l'articulation touchée et les méthodes d'analyses qui sont basées sur des données symptomatiques, radiologiques ou bien anatomiques (Shangha, 2000). Cependant, malgré l'étendue et la diversité de ces études, la plupart des résultats recueillis indiquent que la prévalence de cette pathologie augmente généralement avec l'âge et est élevée par rapport

aux autres maladies rhumatologiques connues (Gabriel et Michaudn, 2009; Arden et Nevitt, 2006).

I.A.4.1 La gonarthrose

L'incidence de l'OA du genou chez les personnes âgées est estimée à 1% par an (Michael et al., 2010). Dans la cohorte de Framingham, la prévalence de la gonarthrose radiographique augmente de 27% chez les personnes âgées de moins que 70 ans à 44% chez les personnes de 80 ans et plus (Felson et al., 1987). Des estimations semblables ont été rapportées dans la 3ème National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) Américaine. Environ 27,4% des personnes âgées de 60 ans et plus sont touchées par cette maladie. Ce pourcentage grimpe à 40% après l'âge de 80 ans (Dillon et al., 2006). Aussi, dans l'étude de Johnston County Osteoarthritis, la prévalence de la gonarthrose a été évaluée à près de 36,1 % après l'âge de 65 ans (Jordan et al., 2007).

Cette maladie touche les femmes et les hommes, mais après la cinquantaine, elle est plus fréquente chez les femmes (Figure 1), (Oliveria et al., 1995). Une étude publiée par Felson et al., a rapporté que la prévalence de l'OA symptomatique du genou est de l'ordre de 11,4% chez les femmes alors que chez les hommes, elle est estimée à 6.8% (Felson et al., 1987). La localisation de la gonarthrose chez les femmes semble être symétrique dans les deux genoux (24.2 % dans le genou droit et 24,7% dans le genou gauche). Tandis que chez les hommes, elle est plus présente dans le genou droit (23%) que dans le genou gauche (16,3%), (Michael et al., 2010).

Côté ethnique, il existe une différence dans la distribution de la prévalence de cette maladie. En effet, la gonarthrose est plus élevée chez les femmes de race noire (23.1%) que chez les femmes de race blanche (8.5%), et à l'inverse des hommes, les femmes de l'étude Framingham sont moins touchées par la gonarthrose que les femmes chinoises (Zhang et al., 2001; Sowers et al., 2000).

La prévalence de l'OA du genou reste encore mal connue dans plusieurs populations. Cependant, les données publiées permettent de confirmer l'importance de cette pathologie par rapport aux autres maladies articulaires.

1.A.4.2 La coxarthrose

L'incidence de l'OA de la hanche est deux fois moins que celle du genou (Oliveria et al., 1995). Elle est plus courante dans la population caucasienne avec une prévalence de 3% à 6% chez les personnes âgées plus que 60 ans et 3 à 4 fois plus présente dans cette race que chez les américains natifs. Aussi, elle est plus répandue chez les femmes caucasiennes que chez les hommes (Hoaglund et al., 2001).

En revanche, cette pathologie est rare chez la population asiatique, de race noire et de l'Inde. Une étude publiée par Nevitt et al., a montré que l'OA de la hanche est 80% à 90% moins fréquente chez la population de la région de Pékin en Chine par rapport à la population de race blanche de l'Amérique, et ceci pour les deux sexes (Nevitt et al., 2002). De même pour la population de Hong Kong et l'est de l'Inde, des études ont rapporté que cette prévalence est beaucoup plus faible dans ces deux pays, elle est estimée à 1% et moins que 0,1%, respectivement (Felson et al, 1998; Hoaglund et al., 2001).

Plusieurs études ont révélé que la différence de prévalence de la coxarthrose entre les populations peut être liée à des facteurs génétiques et environnementaux spécifiques. Ces derniers, sont susceptibles de prédisposer un groupe ethnique par rapport aux autres à développer cette maladie.

I.A.4.3 Arthrose de la main

L'OA symptomatique de la main est une maladie qui touche les personnes âgées, particulièrement les femmes. Felson et al., ont rapporté qu'environ 13,3% des hommes et 26,2% des femmes souffrent de cette maladie. Les joints les plus fréquemment touchés sont les joints distaux et proximaux interphalanges ainsi que les joints à la base du pouce (Yuqing, et al., 2002).

L'origine ethnique a aussi une influence sur le taux de prévalence de cette maladie. L'OA symptomatique de la main est moins répandue dans la population japonaise que dans la population caucasienne. Dans ces deux populations, la prévalence de cette pathologie augmente avec l'âge (Yoshida et al., 2002). De même, l'étude menée par l'équipe de Sowers

et al., a rapporté que chez les femmes de race blanche et noire, l'âge est un facteur clé dans le développement de cette maladie. Les analyses radiographiques ont montré qu'avant la quarantaine, le taux de prévalence est de 1,3%, alors qu'il dépasse les 41% après la cinquantaine. Aussi, ces deux populations présentent le même taux de prévalence avec une significative différence dans la distribution de cette maladie dans les joints de la main. Cette pathologie affecte plus les articulations métacarpo-phalangiennes des femmes de race noire que des femmes de race blanche. Pour les autres articulations de la main, la distribution est la même entre les deux races (Sowers et al., 2000).

À cause de la diversité des méthodologies suivies dans l'analyse et le diagnostic de l'OA de la main, la prévalence de cette maladie reste difficile à déterminer. Néanmoins, la mise en place des stratégies préventives avant la quarantaine pourraient ralentir le développement de cette maladie dans le futur.

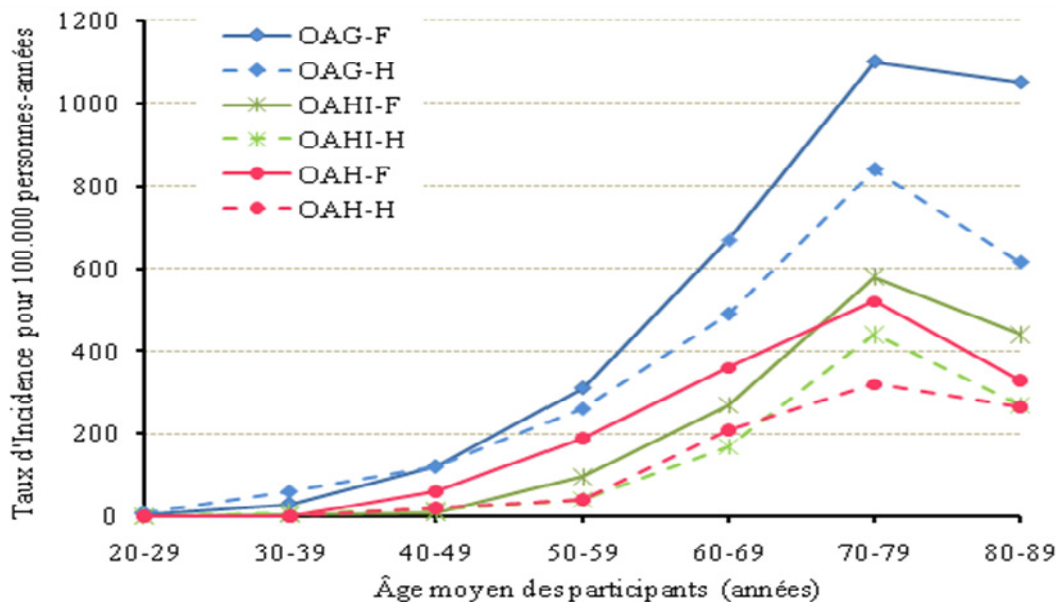


Figure 1: Incidence de l'OA du genou, la hanche et la main chez les membres de la Fallon Community Health Plan. Après l'âge de 50 ans, les femmes ont tendance à développer l'OA plus que les hommes. **OAG-F/H:** OA du genou-femmes/hommes, **OAH-F/H:** OA de la hanche-femmes/hommes, **OAH-F/H:** OA de la main-femmes/hommes (Adapté de (Oliveria et al., 1995)).

I.A.5 Facteurs de risque

La cause spécifique de l'OA demeure inconnue. L'OA est considérée comme une maladie multifactorielle. Plusieurs facteurs de risque s'avèrent liés au développement de cette maladie. Il existe des facteurs systémiques et des facteurs mécaniques locaux.

1.A.5.1 Facteurs de risque systémiques

1.A.5.1.1 Âge

Pendant longtemps, l'OA fut synonyme d'une maladie de vieillissement (Shan et Richard, 2012). Cependant, ce concept s'est considérablement évolué au fil de l'avancement de la recherche. Au cours de la période de vie, pas toutes les personnes âgées développent l'OA, et pas toutes les articulations peuvent être touchées par cette pathologie (Goekoop et al., 2011; Goekoop et al., 2010). Néanmoins, plusieurs études témoignent qu'en synergie avec d'autres facteurs de risque connus, l'âge contribue fortement à l'apparition de cette pathologie (Hügler et al., 2012).

Le vieillissement est un processus naturel affectant les composants de notre corps, notamment les articulations. Étant donné que le cartilage est formé uniquement par un seul type cellulaire et dont la division ralentie en avançant dans l'âge, le maintien de l'homéostasie cellulaire au niveau du cartilage articulaire ainsi que la réponse à des situations de stress devient de plus en plus difficile (Loeser, 2009; Mobasher et al., 2002). Les troubles fonctionnels et environnementaux survenus à la suite de ce déséquilibre au niveau des chondrocytes empêchent la production et le renouvellement normal des différents constituants du cartilage comme les fibres de collagène, les protéoglycanes, les enzymes et les cytokines, ce qui aboutit à la dégénération du cartilage articulaire (Loeser, 2009; Chevalier et Richette, 2005; Hollander, 1995).

1.A.5.1.2 Sexe et hormones

Les études ont montré une différence dans la distribution de l'OA entre les femmes et les hommes (Srikanth et al., 2005). Les femmes ont tendance à développer l'OA plus que les hommes. Ce risque est plus élevé après la ménopause (Felson et Zhang, 1998). Cette

différence entre le sexe reste controversée pour certains sites articulaires comme la hanche. (Maillefert et al., 2003; Ingvarson, 1999; Tepper et Hochberg, 1993).

Selon plusieurs études, le déséquilibre hormonal pourrait favoriser l'apparition de cette maladie chez les femmes ménopausées (Linn et al., 2012). En effet, les estrogènes jouent un rôle important dans le développement et la reproduction. La ménopause est caractérisée par une chute de la production de plusieurs hormones comme les estrogènes (Su et Freeman, 2009). Contrairement à d'autres tissus tels que le cerveau, les reins et les glandes mammaires, il était connu que les tissus articulaires sont insensibles aux effets des estrogènes. Cependant, l'intérêt pour comprendre le rôle potentiel des œstrogènes dans la physiologie des tissus articulaires ainsi que dans l'apparition de cette maladie, a aboutit à la mise en évidence de l'expression de deux types de récepteurs aux estrogènes RE α et RE β au niveau du cartilage articulaire (Roman-Blas et al., 2009).

In vitro, le traitement des cultures cellulaires de chondrocytes avec des doses physiologiques de l'estrogène, plus exactement l'estradiol (E2), provoque l'augmentation de la production protéique du collagène de type II et des protéoglycanes alors qu'avec des doses pharmacologiques, l'E2 favorise la dégradation du cartilage (Maité, 1993).

In vivo, des études sur des souris avec ovariectomie ont montré que l'absence de la production de l'estrogène accélère l'apparition des lésions cartilagineuses. L'administration de l'E2 exogène semble atténuer ces effets (Sniekers et al., 2010).

Des études cliniques ont évoqué que les femmes ménopausées sous traitement hormonal substitutif pour une longue période ont moins de risque de développer cette maladie (Nevitt et al., 1996). Cela a été confirmé par l'équipe de Cirillo et al., le pourcentage des femmes ménopausées sous hormonothérapie et avec des chirurgies de remplacement surtout celle de la hanche était plus faible comparativement à celui des femmes n'ayant subi aucun traitement (Cirillo et al., 2006). Cependant, des études ont rapporté des résultats opposés concernant la relation entre ce traitement et la diminution de l'arthroplastie, et autres affirment qu'il n'y a pas une différence significative entre ces deux groupes de femmes (De Klerk et al., 2009; Von Mühlen, 2002; Zhang et al., 1998).

Selon ces données contradictoires, l'effet des estrogènes dans le développement de l'OA reste difficile à préciser.

1.A.5.1.3 Race et prédisposition génétique

L'existence dans la même famille des personnes atteintes de l'OA laisse à penser que le facteur génétique pourrait avoir un rôle dans l'apparition de cette maladie. Des études épidémiologiques sur des jumeaux monozygotes et dizygotes ainsi que sur des groupes de familles ont démontré une influence du facteur génétique allant de 39% à 65% dans l'OA radiographique de la main et du genou, 60% dans l'OA de la hanche et environ 73% dans l'OA de la colonne vertébrale (cervicale et lombaire) (Spector et al., 2004; Spector et al., 1996). Selon ces résultats, presque 50% des cas d'OA peuvent être liés à des facteurs génétiques (Lee, 2009; Spector et MacGregor, 2004).

Dans le but de mieux comprendre l'implication de ce facteur, des études génétiques ont été effectuées sur des gènes de susceptibilité à l'OA. Les analyses ont révélé un polymorphisme dans plusieurs gènes candidats.

Des variantes génétiques en position 2q13 codant pour la famille du gène IL-1 β seraient responsables de la gonarthrose par rapport à d'autres formes d'OA (Loughlin, 2002). Aussi, plusieurs polymorphismes du gène du récepteur de la vitamine D (RVD) ont été identifiés (Uitterlinden et al., 1997; Keen et al., 1997). D'après certaines études, le génotype du RVD influence la densité osseuse, l'apparition des ostéophytes et la douleur au niveau du genou (Muraki et al., 2011; Uitterlinden et al., 1997; Uitterlinden et al., 1996). Toutefois, ces résultats ne sont pas communs pour toutes les populations. Les études à grande échelle n'ont pas confirmé cette association (Lee, 2009; Baldwin et al., 2002; Huang et al., 2000). D'autres variantes génétiques ont été étudiées sur le gène du récepteur des estrogènes (RE α) (Roman-Blas et al., 2009; Ushiyama et al., 1998). Selon Bergink et al., l'augmentation de la prévalence de la gonarthrose radiographique chez les femmes et les hommes est associée aux polymorphismes d'RE α (Jin et al., 2004; Bergink et al., 2003). Contrairement à la population asiatique, une faible association a été détectée chez les caucasiens (Lian et al., 2007). Il semble aussi que le polymorphisme du gène du collagène de type II serait responsable du

pincement de l'interligne articulaire chez les patients arthrosiques (Uitterlinden et al., 2000). Concernant le facteur de croissance de différenciation (GDF5), des études ont été faites sur différentes populations. Chez les personnes européennes et asiatiques, un polymorphisme au niveau de la région promotrice du gène de GDF5 pourrait être à l'origine de l'inhibition de son expression en empêchant la fixation de son facteur de transcription activateur (YY1), ce qui aboutit à la perturbation de l'homéostasie du cartilage (Dodd et al., 2013). Au contraire, chez la population coréenne et grecque, les résultats n'ont pas montré une implication significative de cette variante génétique dans le fonctionnement de ce gène (Shin et al., 2012; Tsezou et al., 2008).

Le rôle du polymorphisme dans l'OA demeure incertain à cause du faible nombre des participants et l'hétérogénéité des populations étudiées. D'autres analyses doivent être menées dans le futur sur des populations homogènes et plus larges pour confirmer ces données.

1.A.5.1.4 Alimentation

Plusieurs études ont évalué le rôle des suppléments de vitamines dans l'OA. Une étude réalisée par McAlindon et al., avait montré qu'un apport en vitamine D et C pourrait prévenir la progression de la gonarthrose et la coxarthrose radiographique (Lane et al., 1999, McAlindon et al., 1996; McAlindon et al., 1996). De même pour la vitamine E et la bêta carotène, une consommation moyenne était associée à un faible risque de progression de la maladie chez les personnes atteintes (McAlindon et al., 1996). Une étude clinique avec un effectif limité et une courte durée de traitement avait montré que la vitamine E a un rôle dans la diminution de la douleur chez les personnes malades (Blankenhorn, 1986). Cependant, des résultats contradictoires publiés par Brand et al., ont signalé que l'apport en vitamine E n'a pas d'effets sur la gonarthrose symptomatique (Brand et al., 2001).

1.A.5.2 Facteurs de risque mécaniques locaux

1.A.5.2.1 Obésité

Plusieurs études épidémiologiques ont été effectuées pour analyser le rôle de l'obésité dans l'OA. L'excès de poids est une source majeure des contraintes mécaniques sur les

articulations surtout celles des genoux. Une surcharge pondérale pourrait causer un stress répétitif au niveau du cartilage provoquant une perturbation dans la physiologie normale des chondrocytes (Berenbaum et Sellam, 2008). Une étude publiée par Lee et al., a montré que le risque de développer la gonarthrose est 7 fois plus élevé chez les personnes avec un indice de masse corporelle (IMC) dépassant les 30 comparativement à ceux avec un IMC moins que 25 (Lee et Kean, 2012). En plus, il a été rapporté que 27% des arthroplasties de la hanche et environ 69% de celles des genoux sont des conséquences de l'obésité (Grazio et Balen, 2009). Des mécanorécepteurs exprimés au niveau des chondrocytes sont en grande partie responsables de ces événements. En effet, la stimulation de ces récepteurs par une contrainte mécanique pourrait être responsable de la synthèse de nombreux médiateurs arthrosiques conduisant à la destruction du cartilage articulaire (Berenbaum et Sellam, 2008; Gabay et al., 2008).

Des chercheurs ont découvert que l'obésité est un facteur de risque non seulement des articulations portantes mais aussi celles non portantes, par exemple les articulations des mains (Hart et Spector, 1993). Comme publié par Oliveria et al., un poids corporel élevé chez les femmes augmente l'incidence de l'OA symptomatique des mains (Oliveria et al., 1999). Dans ce cas, l'obésité semble jouer un rôle métabolique dans le survenu de ce type d'OA. En effet, les tissus adipeux ont la capacité de sécréter des adipokines comme la leptine, l'adiponectine, la résistine, la visfatine et autres. La quantité produite de ces médiateurs dépend du volume de la matière grasse, ce qui laisse à penser qu'ils ont un lien avec l'obésité (Hu et al., 2011; Berenbaum et Sellam, 2008). Quant au rôle de ces médiateurs dans l'OA, des études contradictoires ont été publiées concernant certaines adipokines.

La leptine est la cytoadipokine la plus étudiée dans l'apparition de l'OA. Des études ont démontré que la leptine joue un rôle dans la stimulation de la synthèse du collagène, des protéoglycanes et favorise la prolifération des chondrocytes (Figenschau et al., 2001). Alors que d'autres ont montré un effet catabolique de la leptine qui se traduit par une synthèse de différents médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , la MMP-9, la MMP-13, l'IL-6 et le monoxyde d'azote (Hu et al., 2011). Cette adipokine a été détectée dans le liquide synovial des articulations arthrosiques humaines, et sa concentration était en corrélation avec l'IMC

des personnes malades. Aussi, les analyses ont démontré une forte expression de la leptine dans le cartilage arthrosique humain par rapport au cartilage normal (Dumond et al., 2003).

D'après ces résultats, l'effet systémique de la leptine semble jouer un rôle majeur dans le développement de l'OA liée à l'obésité. Toutefois, des études additionnelles sont nécessaires pour définir le rôle exact de la leptine ainsi que des autres adipokines dans l'apparition et la progression de cette pathologie.

1.A.5.2.2 Mode de vie

De nombreuses études ont été réalisées dont le but d'analyser la relation entre les activités professionnelles et l'OA. Dans les années 80, Anderson et al., ont trouvé que les participants occupant un emploi qui repose sur une flexion prolongée des genoux ont trois fois plus de chance à développer une gonarthrose (Anderson et Felson, 1988). Au fil des années, ces résultats ont été supportés par d'autres études cliniques. Selon Felson et al., la gonarthrose radiographique est plus élevée chez les participants qui exercent un emploi exigeant une force physique et une flexion des genoux (Felson et al., 1991). Aussi, Cooper et al., ont confirmé qu'une flexion importante et prolongée du genou pourrait être responsable de l'OA, ce risque est plus élevé dans les emplois qui demandent une flexion répétitive du genou accompagnée d'une charge mécanique (Cooper et al., 1994).

Dans ce contexte, il s'est avéré que les activités quotidiennes contribuent fortement à l'apparition de l'OA. Selon Yoshida et al., la population japonaise présente une prévalence faible de l'OA de la main alors que celle des genoux est plus élevée par rapport à la population caucasienne (Yoshida et al., 2002). En effet, l'utilisation des baguettes chinoises demande moins de forces que le couteau et la fourchette. Au cours d'un repas, une compression normale sur les articulations des doigts de la main est estimée à 3 kg aux articulations interphalangiennes, 5,4 kg aux articulations métacarpo-phalangiennes et environ 12 kg à la base du pouce alors qu'une compression forte pourrait atteindre les 120 kg (Cooney et Cho, 1977). De ce fait, les baguettes chinoises favorisent moins le développement de cette maladie chez cette population. Concernant la gonarthrose, l'utilisation des toilettes traditionnelles en position accroupie et/ou le tatami avec les genoux collés et pliés tous les

jours pourraient expliquer la différence de cette prévalence entre les deux populations (Yoshida et al., 2002). En plus, Kivimäk et al., ont rapporté que les poseurs de planchers et du tapis sont plus atteints de la gonarthrose que les peintres (Kivimäki, et al., 1992).

1.A.5.2.3 Traumatismes articulaires

Les traumatismes articulaires représentent l'un des principaux facteurs de risque de l'OA. Ils se produisent généralement chez les jeunes lors des activités sportives compétitives (Bahr et al., 2003). Une étude clinique publiée par Takeda et al., a montré que la prévalence de la gonarthrose chez les anciens joueurs de football professionnel varie entre 29% à 22%, 14% à 20% chez les coureurs de longue distance et environ 31% chez les haltérophiles (Tableau 1), (Takeda et al., 2011). Les traumatismes articulaires peuvent être associés ou non à des événements symptomatiques. Cependant, dans la plupart des cas, ils sont à l'origine de plusieurs problèmes articulaires tels que des fractures, des déchirures méniscales, des lésions ligamentaires et capsulaires. Cette situation est susceptible de mener à un déséquilibre au niveau de l'articulation et le développement de l'OA (Buckwalter, 2003).

Plusieurs études ont tenté d'expliquer la relation entre les traumatismes articulaires et le développement de l'OA. Une étude publiée par Herzog et al., a rapporté que des lésions expérimentales au niveau des ligaments ou des ménisques chez différents modèles animaux accentuent le risque de développer la gonarthrose (Herzog et al., 2003). Ces résultats ont été confirmés par des études cliniques chez les humains. En effet, la chance de développer la gonarthrose est estimée 10 fois plus chez les personnes avec une lésion du ligament croisé antérieur que chez une population normale de même âge, et elle est plus élevée en présence d'une rupture du ménisque. Cependant, une réparation ligamentaire pourrait diminuer mais ne pas éliminer le risque de développer cette maladie (Takeda et al., 2011; Øiestad et al., 2009; Jomha et al., 1999).

D'après ces résultats, le traitement étant chirurgicale ou non ne semble pas éviter le développement de la gonarthrose. Toutefois, la prévention reste le seul moyen pour éviter la survenue de cette maladie. Dans ce contexte, une étude a été effectuée chez des footballeurs a montré que des échauffements spécifiques avant l'entraînement sont indispensables pour

diminuer le risque des lésions ligamentaires (Soligard et al., 2008). Selon Felson et al., l'implantation d'un programme de formation pour prévenir les accidents articulaires lors des activités sportives pourrait diminuer 14% à 25% le risque de développer l'OA (Felson et al., 1998).

Tableau 1: Prévalence de l'OA des genoux dans différentes activités sportives (Adapté de (Takeda et al., 2011; Chakravarty, 2008; Turner et al., 2000; Kujala et al., 1995; Roos et al., 1994)).

Auteurs	Activités sportives	Nombre des participants	Prévalence de l'OA des genoux
Roos et al.,	Anciens joueurs de football	286	-15,5 % -1,6% (groupe témoin)
Turner et al.,	Anciens joueurs de football professionnel	284	-29% (genou droit) -22% (genou gauche)
Kujal et al.,	Anciens athlètes de haut niveau	117	-29% (football) -31% (haltérophilie) -14% (course)
Chakravarty et al.,	Coureurs de longue distance	45	-20%

I.A.6 Symptômes et diagnostic de l'arthrose

L'arthrite regroupe plusieurs maladies qui affectent les articulations, ayant chacune une origine différente. La douleur, la raideur et l'enflure sont des symptômes communs pour la plupart des maladies rhumatismales, et sont les principales causes des consultations médicales. On retrouve par contre des caractéristiques et signes spécifiques qui permettent de différencier l'OA par rapport à d'autres formes d'arthrite.

Généralement, l'OA affecte un nombre limité d'articulations. Celles-ci sont touchées de façon asymétrique. L'OA est associée à une douleur mécanique intermittente déclenchée suite à une surcharge et/ou une mobilisation de l'articulation. Au lever, la raideur persiste moins de 30 minutes au niveau du site affecté. Un bruit de craquement inhabituel est détecté lorsqu'une articulation est en mouvement. À un stade précoce de la maladie, l'OA peut être associée à une déformation de l'articulation sans signe local d'inflammation. Cependant, des fragments de cartilage pourraient se détacher avec la progression de la maladie provoquant une inflammation articulaire (Sinusas, 2012; Ross et al., 1997).

Pour révéler les principales caractéristiques de l'OA, un diagnostic médical est donc établi. Le médecin interroge le malade sur son historique médical et celui de sa famille, les différents signes et symptômes survenus, le moment de leur apparition et disparition ainsi que leur fréquence et impact sur la qualité de sa vie quotidienne. À la suite de cette interrogation, le médecin procède à un examen physique des différents sites affectés (Hinton et al., 2002).

La radiographie classique vient par la suite pour confirmer le diagnostic et définir la gravité de la maladie. Une articulation affectée présente un pincement de l'espace interarticulaire suite à l'usure du cartilage, des excroissances osseuses ainsi qu'une condensation et érosion de l'os sous-chondral (Knoop et al., 2012; Cibere, 2006).

Il n'existe aucune analyse biologique permettant d'identifier une arthrose précoce ou bien de juger l'évolution de cette maladie. Toutefois, ces analyses peuvent être nécessaires pour exclure la possibilité d'autres types d'arthrite.

L'OA est une maladie articulaire progressive. Les symptômes associés à cette maladie n'apparaissent pas simultanément. Certains peuvent se développer au début de la maladie alors que d'autres dans des stades plus développés. Donc, le recours à des examens plus avancés comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la scintigraphie osseuse et l'échographie peuvent être utiles pour diagnostiquer cette pathologie. (Sinusas, 2012; Cibere, 2006). Néanmoins, comme pour d'autres formes d'arthrite, un examen médical précoce est un élément clé dans la prévention de cette maladie.

I.A.7 Traitements de l'arthrose

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitements permettant de guérir l'OA. Cependant, plusieurs stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées pour soulager les symptômes et ceci en fonction de la sévérité de cette maladie. Elles sont axées sur des traitements non pharmacologiques, pharmacologiques et chirurgicaux (Sinusas, 2012; Zhang et al ., 2010).

Le traitement non pharmacologique est conseillé dans un stade précoce de l'OA. Le patient est amené à adopter une bonne hygiène de vie, notamment une alimentation saine, un poids santé ainsi que la pratique des exercices physiques adaptés à sa situation (Heidari, 2011).

Si l'état du patient ne s'améliore pas, des traitements médicamenteux peuvent être utilisés. Il s'agit des médicaments à prise orale, à injecter ou bien à appliquer directement au niveau de l'articulation affectée. Dans un premier lieu, le paracétamol est recommandé pour soulager la douleur légère à modérée. Devant une douleur sévère et une inflammation, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont prescrits. Cette classe de médicaments présente souvent des effets secondaires, par exemple des lésions gastriques et des problèmes cardiovasculaires. Elle est utilisée avec précaution chez les personnes à risque et est combinée habituellement à d'autres médicaments pour minimiser les effets secondaires (Zhang, 2010).

Lorsque le patient ne répond pas adéquatement aux antalgiques et anti-inflammatoires, des injections intra-articulaires des corticostéroïdes sont envisagées comme un traitement à court terme. Elles sont utilisées pour soulager une douleur et une inflammation sévère (Zhang et al ., 2010).

Contrairement aux corticoïdes, des injections intra-articulaires d'acide hyaluronique peuvent être utilisées en absence d'une inflammation. L'acide hyaluronique est un lubrifiant de l'articulation. Il améliore la viscosité du liquide synoviale et favorise les glissements des surfaces articulaires permettant ainsi de réduire l'intensité de la douleur. L'acide hyaluronique est caractérisé par une action lente mais prolongée par rapport aux corticoïdes (Zhang et al ., 2008, Wang et al., 2004).

La glucosamine et/ou la chondroïtine sulfate peuvent exercer un effet bénéfique dans le soulagement des symptômes chez les patients arthrosiques. Des études cliniques ont rapporté une amélioration dans la fonction de l'articulation du genou et la diminution de la douleur. Il semblerait que ces deux composés modifient la structure du cartilage en favorisant sa croissance. Aussi, il a été démontré que la combinaison de ces deux composés est plus bénéfique que lorsque qu'ils sont administrés séparément. Malgré des preuves cliniques positives sur l'utilisation de la glucosamine et/ou la chondroïtine dans l'OA, le rôle thérapeutique de ces composés reste douteux pour certains scientifiques (Henrotin et al., 2014; Zhang et al., 2010).

La prescription d'opiacés pourrait être utile en cas d'une douleur insupportable et persistante, non atténuée par les autres types de médicaments. Aussi, les opiacés sont utilisés chez les patients présentant une intolérance aux AINS. Dans cette catégorie de médicaments, le tramadol et la codéine deux opiacés faibles sont les plus prescrits. Parfois, des opiacés plus puissants sont envisagés dans des conditions extrêmes. À ce stade de la maladie, des traitements chirurgicaux doivent être conseillés (Zhang et al., 2010).

La chirurgie vient en dernier recours lorsque la combinaison des traitements non pharmacologiques et pharmacologiques échoue ou n'est pas suffisante pour soulager la souffrance du patient. Elle consiste à un remplacement partiel ou total de l'articulation touchée, ce qui favorise la disparition de la douleur et améliore la qualité de vie des personnes qui vivent avec cette maladie (Heidari, 2011; Anandacoomarasamy et March, 2010; Zhang et al., 2010).

I.A.8 Impact socio-économique de l'arthrose

Bien que l'OA soit un problème de santé publique, elle est aussi devenue un problème pour l'économie de plusieurs pays même les plus développés. Des estimations publiées en 2012 ont suggéré qu'environ 250 millions de personnes souffrent de l'OA dans le monde. Elle représente 2,2% des années vécues avec l'incapacité (AVI) et environ 10% des AVI de l'ensemble des troubles musculo-squelettiques (Vos et al., 2012; Murray et al., 2012). L'impact socio-économique de l'OA est énorme, il représente 1% à 2,5% du produit national

brut de plusieurs pays comme la France, l'Australie, le Royaume-Uni, les États-Unis et le Canada (Hunter, 2014; March et Bachmeier, 1997).

Dans son rapport « L'impact de l'arthrite au Canada : aujourd'hui et au cours des 30 prochaines années » publié en 2011, alliance de l'arthrite du Canada a indiqué que 4,4 millions de personnes sont affectées par l'OA et que d'ici 30 ans, presque une personne sur quatre devrait être touchée par cette maladie, soit 10 millions de Canadiens (Bombardier et al., 2011).

Au Québec, l'OA est la maladie qui a le plus d'impact sur la santé fonctionnelle. Elle se démarque par un taux élevé des AVI en comparaison avec d'autres maladies comme le diabète, l'asthme, l'hypertension et autres (Martel et Steensma, 2012). Cela signifie que cette maladie affecte fortement le nombre des personnes au travail. Selon des prévisions, dans une génération, environ un travailleur sur trois aura des difficultés pour travailler à cause de l'OA, ce qui correspond à 30 % des employés actifs (Bombardier et al., 2011).

La prise en charge précoce des personnes malades, la mise en place des programmes d'éducation et de prévention pourraient réduire fortement l'impact social et économique de cette maladie (Bombardier et al., 2011).

I.B Articulation du genou

I.B.1 Structure de l'articulation du genou

Le genou est une articulation complexe réunissant deux extrémités osseuses recouvertes d'un revêtement lisse, le cartilage articulaire. La concordance des deux extrémités est assurée par la présence des ménisques qui reposent sur les surfaces articulaires jouant le rôle d'amortisseur. L'ensemble est relié par une capsule fibreuse et renforcé par différentes structures comme les ligaments, les muscles et les tendons assurant ainsi une stabilité au genou lors des mouvements articulaires (Figure 2). La face interne de la capsule articulaire est tapissée par la membrane synoviale. Celle-ci secrète le liquide synovial, une substance visqueuse qui baigne dans un espace qu'elle délimite avec le cartilage portant le nom de

cavité articulaire. Le liquide synovial assure plusieurs fonctions comme la nutrition du cartilage et la lubrification des surfaces articulaires (Blackburn et Craig, 1980).

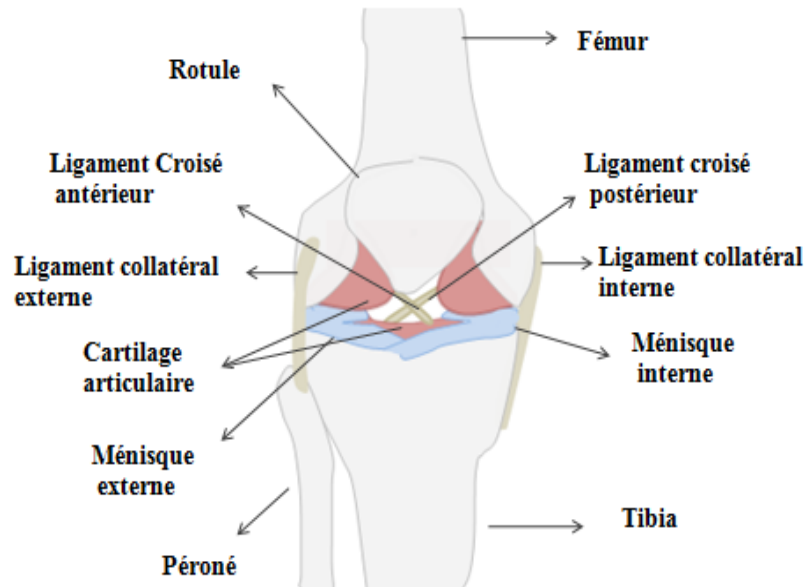


Figure 2: Structure d'une articulation du genou.

I.B.2 Composition de l'articulation du genou

Le genou est une articulation très mobile entraînant tout notre corps dans le mouvement. Il est caractérisé par un fonctionnement extrêmement complexe faisant intervenir de nombreuses composantes qui travaillent en harmonie afin d'assurer sa stabilité lors des mouvements articulaires.

I.B.2.1 Cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif sans vascularisation ni innervation. Il joue un rôle très important dans la mobilité de l'articulation en empêchant les frottements entre les deux extrémités osseuses qui enrobent, notamment celles du fémur et du tibia. Le cartilage articulaire est de couleur blanche avec une surface lisse et brillante. Son épaisseur diffère d'une articulation à l'autre. Elle varie entre 6 et 7 mm pour le genou (Jian et al., 2008).

D'un point de vue histologique, le cartilage articulaire peut être divisé en quatre zones différentes allant de la surface articulaire à l'os sous-chondral (Figure 3). La zone

superficielle (ou tangentielle) est en contact avec le liquide synoviale. Elle est caractérisée par un nombre élevé de cellules chondrocytaires de forme aplatie, du collagène spécifiquement de type II et une faible quantité de protéoglycanes. L'ensemble est disposé parallèlement à la surface articulaire. Cette région facilite les glissements des extrémités osseuses et la résistance aux forces de cisaillement. La deuxième zone située au dessous de la zone superficielle est nommée, la zone intermédiaire (ou transitionnelle). Elle est constituée d'une faible densité de chondrocytes disposés sous forme sphérique, des fibres de collagène et une concentration plus élevée de protéoglycanes par rapport à la première zone. Après, il y a la troisième couche (ou zone profonde). Celle-ci est composée de cellules plus volumineuses disposées en colonnes, des fibres de collagène plus épais orientés perpendiculairement à la surface articulaire et dont les extrémités s'infiltreront dans la couche sous adjacente (ou couche calcifiée). La grande richesse de cette région en protéoglycanes lui confère une forte résistance aux différentes contraintes mécaniques imposées par l'articulation et ceci en comparaison avec les autres régions. La zone calcifiée est située entre l'os sous-chondral et la zone profonde. Elle renferme des cellules hypertrophiées qui sont à l'origine de la synthèse des fibres du collagène de type X. Elle est séparée de la zone profonde par une fine ligne appelée « Tidemark ». Conjointement à la zone calcifiée, cette ligne de démarcation semble limiter l'invasion vasculaire du cartilage et le passage des molécules dans les deux directions (Broom et Poole, 1982). La surface de séparation de la couche calcifiée et l'os sous-chondral n'est pas alignée, ce qui favorise l'ancrage du cartilage articulaire dans la plaque sous chondral (Sophia Fox et al., 2009; Zhang et al., 2009; Buckwalter et Mankin, 1997).

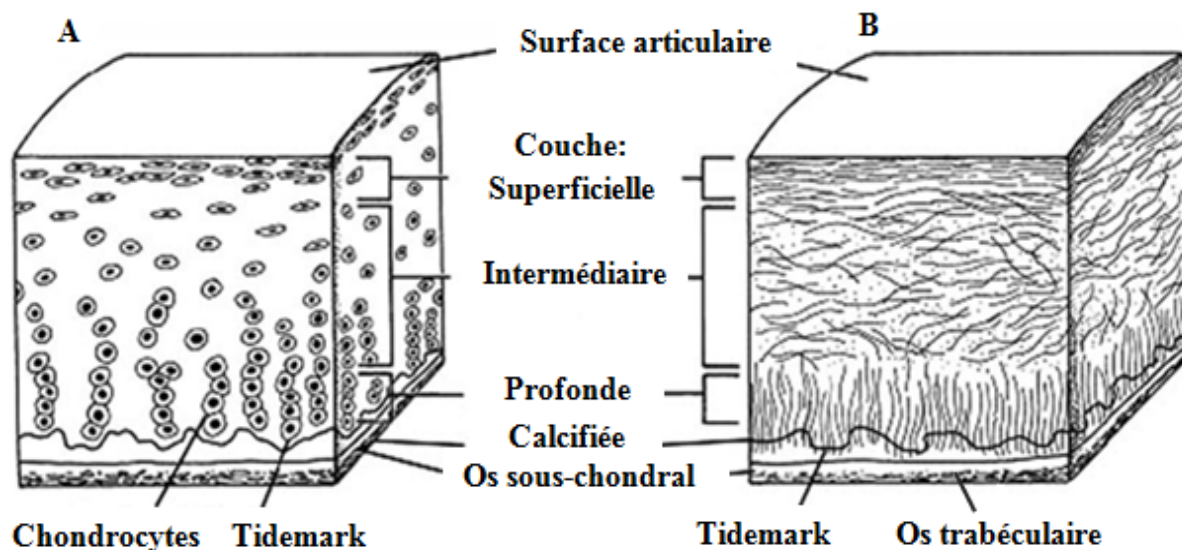


Figure 3: Structure des différentes couches du cartilage articulaire. Organisation des chondrocytes (A) et des fibres de collagène (B) dans le cartilage articulaire (Adapté de (Sophia Fox et al., 2009)).

I.B.2.1.1 Composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est constitué d'un faible pourcentage de cellules, les chondrocytes, dispersées dans une matrice extracellulaire formée essentiellement d'eau, de collagènes et de protéoglycanes. Cette structure serait à l'origine de ses propriétés fonctionnelles.

I.B.2.1.1.1 Chondrocytes

Les chondrocytes sont le seul type cellulaire dans le cartilage articulaire. Ils représentent environ 10% du poids humide du cartilage (Sophia Fox et al., 2009; Cohen et al., 1998). Ces cellules d'origine mésenchymateuse ne sont pas en contact les unes par rapport aux autres mais elles sont capables de répondre à des différents stimuli provenant du milieu environnant (Sophia Fox et al., 2009). Les chondrocytes sont très actifs métaboliquement. Ils jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre physiologique de la matrice extracellulaire. En effet, ils sont responsables du développement, de la régulation métabolique et la réparation de celle-ci (Cohen et al., 1998). Cependant, ils vivent constamment en milieu

anaérobie, et donc leur remplacement est limité à l'âge adulte, ce qui favorise le développement de l'OA (Bhosale et Richardson, 2008).

I.B.2.1.1.2 Eau

L'eau est le composé le plus abondant dans le cartilage articulaire. Sa concentration varie en fonction de la profondeur de celui-ci. Elle représente environ 80% du volume total du cartilage dans la zone superficielle et vers 65% dans la zone plus profonde. L'eau confère au cartilage sa propriété élastique et assure sa lubrification. Le mouvement de l'eau déclenché lors des activités quotidiennes favorise les échanges et donc l'apport des nutriments (Sophia Fox et al., 2009).

Le maintien de l'équilibre osmotique est crucial pour que le cartilage garde ses propriétés fonctionnelles. En effet, lors des stimulations mécaniques répétitives, l'eau est enchâssée en dehors du cartilage ce qui diminue sa résistance. De même, une forte teneur en eau qui dépasse les 90% est liée souvent à une diminution de l'élasticité, et donc sa capacité à rétablir sa forme initiale après une déformation causée par des charges mécaniques (Bhosale et Richardson, 2008; Linn et Sokoloff, 1965).

I.B.2.1.1.3 Collagène

Le collagène est un constituant majeur du cartilage articulaire. Il occupe 60% de son poids sec. Il existe plusieurs types de collagènes : I, II, III, IV, V, VI et autres. Le collagène de type II est le plus abondant et représente environ 90% de l'ensemble des collagènes du cartilage (Buckwalter et Mankin, 1997). Le collagène est une protéine qui se présente le plus souvent sous forme fibrillaire. Il est constitué de trois chaînes alpha polypeptidiques de 1055 acides aminés dont la glycine, la proline et l'hydroxyproline. L'ensemble est agencé en triple hélice et stabilisé par des liaisons d'hydrogène (Sophia Fox et al., 2009).

Le ratio longueur/diamètre des fibres de collagène II ne leur offre pas une grande résistance aux contraintes mécaniques. En effet, ces fibres ont tendance à boucler sous l'effet des forces de compression. Cependant, ils sont très résistants à l'étirement, et sont en fait, le

principal composant chargé de fournir la propriété élastique au cartilage lors des mouvements articulaires (Figure 4), (Myers et al., 1984).

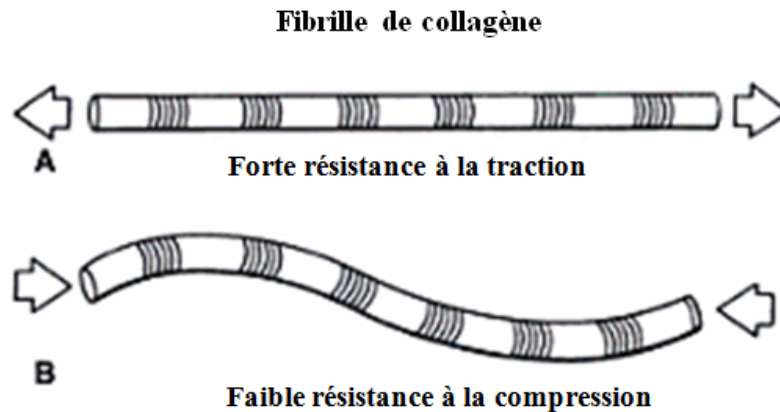


Figure 4: Propriétés mécaniques des fibrilles de collagène. (A) Une forte résistance à la traction, mais faible aux forces de compression (B), (Adapté de (Myers et al., 1984)).

I.B.2.1.1.4 Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des macromolécules matricielles produites par les chondrocytes et secrétées dans la matrice extracellulaire. Ils représentent environ 10% à 20% du poids humide du cartilage articulaire. Ils sont dotés d'une charge négative permettant la rétention de l'eau et donc leur confère un caractère hydrophile. Cette propriété est à l'origine de leurs rôles dans l'amortissement des chocs, la lubrification et la résistance à des forces de compression. Ainsi, ils assurent une protection et une stabilité à l'articulation. (Bhosale et Richardson, 2008; Buckwalter et Mankin, 1997).

Les protéoglycanes sont des protéines aux quelles s'attachent de nombreuses chaînes de glycosaminoglycanes. Parmi ces derniers, on retrouve l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et le kératane sulfate. La concentration de ces composants dans la matrice extracellulaire varie en fonction de l'état et la maturité du cartilage (Buckwalter et Mankin, 1997; Buckwalter et al., 1985).

Il existe une variété de protéoglycanes dans le cartilage articulaire, notamment l'aggrécane, le biglycane, la décorine et la fibromudiline. L'aggrécane est le type le plus abondant. Il représente 90 % de la masse totale des protéoglycanes (Sophia Fox et al., 2009). L'association de cette molécule avec l'acide hyaluronique par des protéines de liaison forme des agrégats de protéoglycanes (Tang et al., 1996; Buckwalter et Rosenberg, 1988). Celles-ci participent à la stabilité du protéoglycane dans la matrice en empêchant son déplacement lors de la déformation du cartilage articulaire (Buckwalter et Mankin, 1997). Pour les autres types de protéoglycanes de taille plus petite, ils sont connus par leur capacité à interagir avec le collagène. La décorine et la fibromudiline s'associent aux fibres du collagène de type II alors que le biglycane au collagène de type VI. Ces molécules interviennent dans la liaison des chondrocytes avec leur milieu, dans la stabilité du réseau interfibrillaire du collagène ainsi que dans l'organisation structurale et métabolique de la matrice extracellulaire (Sophia Fox et al., 2009; Buckwalter et Mankin, 1997).

I.B.2.1.2 Nutrition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire pourrait se nourrir par deux voies possibles, soit par diffusion à partir du liquide synovial et/ou à travers du tissu osseux. Cette hypothèse reste encore controversée.

Des études faites chez différentes espèces animales ont rapporté que le cartilage articulaire immature utilise les deux voies pour maintenir son équilibre nutritionnel (McKibbin et Holdsworth, 1966) alors que le cartilage articulaire mature se nourrit plus spécifiquement du liquide synovial, et le blocage de cette voie semble favoriser une dégradation du cartilage articulaire plus sévère en comparaison avec le blocage de la voie de l'os sous-chondral (Wang et al., 2013; Hodge et McKibbin, 1969). Ces résultats ont été confirmés chez l'humain surtout au niveau de l'articulation du genou (Maroudas et al., 1968). Contrairement à ces études, Greenwald et al., ont rapporté qu'au niveau de la tête fémoral humaine adulte, des substances de faible poids moléculaires pourraient diffuser à partir du tissu osseux jusqu' au cartilage articulaire (Greenwald et Haynes, 1969). Ceci a été supporté par Tim et al., qui ont montré par des expériences histologiques, l'existence de plusieurs prolongations du cartilage non calcifié qui projettent sur la surface de l'os sous-chondral.

Cette organisation semble faciliter le passage de différentes molécules entre les deux structures articulaires (Figure 5), (Tim et al., 2006).

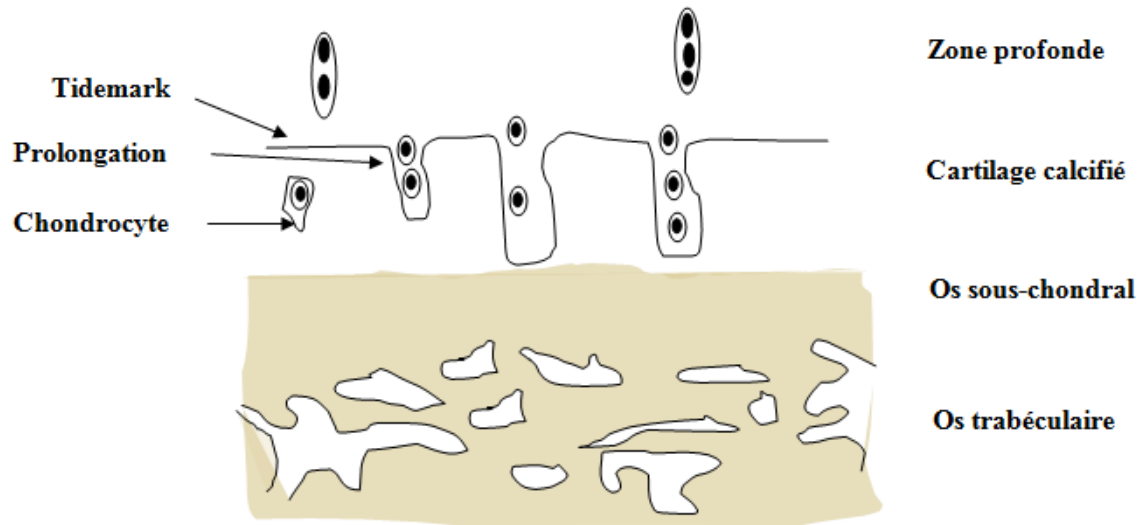


Figure 5: Organisation de la jonction ostéochondrale du cartilage articulaire. La structure irrégulière de Tidemark pourrait être à l’origine des interactions entre le cartilage non calcifié et l’os sous-chondral (Adapté de (Tim et al., 2006)).

I.B.2.2 Ménisques

Le ménisque est une structure fibro-cartilagineuse située entre les condyles de fémur et le plateau du tibia. L’articulation du genou contient deux ménisques de forme différente, le ménisque interne (ou médial) et le ménisque externe (ou latéral) (Makris et al., 2011).

Le ménisque interne a une forme semi lunaire qui s’étale sur 60% de la surface articulaire. Il est connu par sa stabilité grâce à son adhérence à la capsule articulaire et son attachement au ligament collatéral médial. Contrairement à celui-ci, le ménisque externe est généralement de forme circulaire et occupe plus que 80% de la surface articulaire. Il est séparé partiellement de la capsule articulaire par le tendon et fixé à l’articulation par des ligaments accessoires. Cette structure explique sa grande mobilité lors des mouvements articulaires (Fox et al., 2012; Makris et al., 2011; Chivers et Howitt, 2009).

Le ménisque est caractérisé par sa forte teneur en eau occupant 72% de son poids humide, le reste constitue la matrice extracellulaire. Celle-ci regroupe du collagène, de protéoglycanes plus spécifique l'aggrécane et différents types cellulaires dont la quantité et la distribution diffèrent en fonction de la région du ménisque (Fox et al., 2012; Makris et al., 2011).

Les zones périphériques des ménisques sont riches en collagène de type I et une quantité faible des autres variantes de collagène, notamment le type III et V. Alors que les régions centrales sont composées de 60% du collagène de type II et de 40% du collagène de type I. En plus, l'aggrécane est plus abondant dans ces régions qu'en périphérie. D'autres types de protéoglycanes de taille plus petite sont aussi présents mais en faible quantité comme le biglycane, la décorine et la fibromudiline (Makris et al., 2011; Scott et al., 1997; McNicol et Roughley, 1980).

Pour ce qui concerne les cellules, elles sont présentes dans le ménisque avec des caractéristiques morphologiques différentes en fonction de la profondeur du tissu. Dans la zone superficielle, les cellules ont un aspect fusiforme avec un comportement proche des fibroblastes. En profondeur, elles prennent un aspect ovoïde qui ressemble plus à des chondrocytes d'où leur appellation: fibrochondrocytes méniscaux (Verdonk et al., 2005; Nakata et al., 2001).

La vascularisation du ménisque varie en fonction de l'âge des individus. Karola et Jizong ont rapporté dans leur article qu'au stade prénatal, le ménisque est entièrement vascularisé (Karola et Jizong, 1998). Après la naissance cette vascularisation commence à diminuer progressivement pour atteindre 10 à 30% de la surface des ménisques. À un âge adulte, la vascularisation ne dépasse pas les 20 % et touche spécifiquement les régions périphériques des ménisques (Makris et al., 2011; Karola et Jizong, 1998).

De ce fait, la composition structurale du ménisque lui offre plusieurs propriétés fonctionnelles, notamment la nutrition, la lubrification, l'amortissement des chocs, la proprioception, la distribution des charges le long de la surface articulaire et la stabilité du genou lors des mouvements (Fox et al., 2012; Gray et al., 1999).

I.B.2.3 Membrane synoviale

La membrane synoviale est faite de tissu conjonctif lâche contenant des fibres élastiques, des collagènes, des tissus adipeux et des cellules. L'ensemble est organisé en différentes couches dont les plus importantes nommées subintima et intima (Malcolm, 2011; Smith, 2003).

La couche subintima est composée des cellules d'aspect fibroblastique et macrophagique. Elle est plus vascularisée en comparant avec la couche intima. Elle est caractérisée par la présence de nombreux capillaires, des artérioles et des vaisseaux lymphatiques. Cette couche est séparée de la capsule articulaire par un revêtement fibrograisseux (ou couche subsynoviale) composé de différents vaisseaux de taille plus grande (Schneider, 2007; Iwanage, 2000; Lindblad et Hedfors, 1987).

La couche intima, ou bordante, est en contact avec la cavité articulaire où se trouve le liquide synovial. Elle est formée par deux types de cellules, les synoviocytes de type A et de type B. Les synoviocytes de type A sont des cellules de type macrophagique. Ils se localisent généralement dans les régions superficielles. Au microscope, ils apparaissent sous forme sphérique riche en vacuoles et en lysosomes. Grâce à leur capacité de migration à l'intérieur de la cavité articulaire, ils jouent un rôle important dans le nettoyage articulaire en phagocytant les débris présents à l'intérieur de l'articulation. Aussi, ces cellules participent aux réponses immunologiques à cause de l'expression à la surface de leur membrane des molécules de la classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Contrairement au premier type de cellules, les synoviocytes de type B sont des cellules d'allure fibroblastique. La majorité de ces cellules sont localisées dans des régions plus profondes en projetant des ramifications cytoplasmiques à la surface de la membrane synoviale. Ils se caractérisent principalement par la présence d'un important réticulum endoplasmique granuleux. En effet, ils sont responsables de la synthèse de nombreux composants comme l'acide hyaluronique, un produit important qui confère au liquide synovial son caractère lubrifiant (Schneider, 2007; Iwanage, 2000; Lindblad et Hedfors, 1987).

En résumé, la membrane synoviale possède plusieurs rôles physiologiques très importants au bon fonctionnement articulaire. La membrane synoviale confère au liquide synovial son caractère viscoélastique et lubrifiant par la synthèse de l'acide hyaluronique, ce qui favorise l'absorption des chocs mécaniques. Elle élimine les débris des cellules et du cartilage présents dans l'environnement articulaire. Aussi, elle participe dans la composition de liquide synovial en assurant les échanges entre le sang et la cavité articulaire.

I.B.2.4 Ligaments

Les ligaments sont des structures très solides assurant la liaison de deux extrémités osseuses formant une articulation. Ils sont constitués de tissu conjonctif composé essentiellement du collagène de type I et III, de protéoglycanes ainsi que des cellules d'aspect fibroblastique disposées en forme de colonnes parallèles aux fibrilles du collagène (Rumian, 2007). Une articulation du genou est composée de deux principaux types de ligaments, les ligaments croisés situés au milieu de l'articulation, il en existe deux: le ligament croisé postérieur et le ligament croisé antérieur, et les ligaments collatéraux localisés en périphérie, ils sont également en nombre de deux: le ligament collatéral externe et le ligament collatéral interne. Ces ligaments sont considérés d'une grande importance fonctionnelle car ils jouent un rôle important dans la stabilité du genou (Last, 1948).

Pour les autres types de ligaments, il existe plusieurs études controversées sur leurs fonctionnalités. En effet, Gupte et al., ont montré que ces ligaments ne sont pas toujours présents ou visibles sur l'IRM, et que cette variabilité leur confère une fonction articulaire restreinte (Gupte et al., 2002). Ces résultats ne sont pas confirmés par d'autres auteurs qui les considèrent aussi importants que les ligaments croisés et collatéraux, et qu'ils sont présents chez la majorité des individus (Landreau et al., 2003). Clancy et al., ont montré que les patients avec une rupture du ligament croisé postérieur, et dont les ligaments ménisco-fémoraux sont intacts ont un tiroir postérieur réduit permettant ainsi un meilleur pronostic que les patients sans ce type de ligaments (Clancy et al., 1983). Aussi, des études faites chez des animaux ont montré la présence des mécanorécepteurs au niveau des ligaments ménisco-fémoraux et tibiaux, et donc leur implication dans la proprioception (O'Connor, 1984). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats chez l'humain.

I.B.2.5 Tissu osseux

L'os est un tissu très dynamique assurant des rôles essentiels pour le corps humain tant sur le plan biomécanique que sur le plan métabolique. Le tissu osseux assure plusieurs fonctions mécaniques liées à sa résistance et son support du poids corporel. Aussi, il assure la protection des organes internes vitaux (cerveau, poumons, cœur...) et la moelle osseuse. Sur le plan métabolique, le tissu osseux a un rôle physiologique très important car il est responsable du métabolisme du calcium de l'organisme et renferme une grande quantité des minéraux dont l'homéostasie est importante pour une bonne santé (Clarke, 2008).

I.B.2.5.1 Organisation du tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif spécialisé. Il est composé d'une matrice extracellulaire et différents types cellulaires. La matrice extracellulaire est constituée d'une phase organique et une autre minérale. La phase organique contient essentiellement des fibres du collagène de type I et une substance fondamentale comprenant des glycosaminoglycanes, de l'acide hyaluronique, des protéines non collagéniques (l'ostéopontine, l'ostéocalcine.....) et une faible quantité de lipides. La phase minérale est composée de sels minéraux comme le calcium, le phosphore ainsi que des cristaux d'hydroxyapatite qui sont responsables de la dureté et la rigidité de l'os. Concernant les types cellulaires, on retrouve des cellules en repos recouvrant les surfaces osseuses portant le nom des cellules bordantes, des ostéoblastes, des ostéocytes qui sont responsables de la formation osseuse et des ostéoclastes qui ont pour rôle la résorption du tissu osseux (Hadjidakis et Androulakis, 2006; Toppets et al., 2004).

Selon son origine embryonnaire, l'os peut être divisé en deux principales catégories: Les os plats qui se forment par ossification membranaire qui se caractérisent par une différenciation directe des cellules mésenchymateuses et les os longs qui se forment par croissance endochondrale nécessitant un modèle cartilagineux. Celui-ci sera progressivement détruit et remplacé par du tissu osseux. Nous nous intéresserons dans cette partie à la deuxième catégorie où on retrouve les os qui forment l'articulation du genou, notamment le fémur et le tibia (Clarke, 2008; Hadjidakis et Androulakis, 2006; Toppets et al., 2004).

I.B.2.5.2 Os sous-chondral

L'os péri articulaire peut être séparé anatomiquement en deux entités: la plaque sous-chondrale et l'os trabéculaire sous-chondral. Le terme « os sous-chondral » est souvent utilisé pour désigner les deux structures (Goldring et Goldring, 2010; Madry et al., 2010). La plaque sous-chondrale est une mince couche de l'os cortical généralement vascularisée et non poreuse (Milz et Putz, 1994). Elle est située entre le cartilage calcifié et l'os trabéculaire, et son épaisseur varie entre 1 et 3 mm. La plaque sous-chondrale joue un rôle important dans l'absorption des chocs mécaniques subis et constitue une surface d'échange par laquelle l'os pourrait fournir des nutriments au cartilage articulaire (Burr et Gallant, 2012; Pesesse et al., 2011). Selon Imhof et al., les vaisseaux sanguins qui se retrouvent dans la plaque sous-chondrale sont en contact direct avec les couches profondes du cartilage, notamment la couche calcifiée, et ils semblent fournir environ 50% du besoin de cartilage en eau, glucose et oxygène (Henrotin et al., 2012; Imhof et al., 2000). En dessous de cette plaque, on retrouve l'os trabéculaire sous-chondral. Contrairement au premier, celui-ci est fortement poreux. Il est composé d'un réseau de travées entre lesquelles on trouve le tissu hématopoïétique. En effet, l'os trabéculaire sous-chondral joue un rôle important dans la physiologie de l'os. Il est en perpétuel renouvellement à cause de sa forte activité métabolique (Clarke, 2008; Hadjidakis et Androulakis, 2006). Aussi, il s'est avéré que la microarchitecture des trabécules, notamment leur nombre, épaisseur et orientation confèrent à l'os trabéculaire sous-chondral une résistance aux contraintes mécaniques (John et al., 2008).

I.C Physiopathologie de l'arthrose

I.C.1 Structures affectées par l'arthrose

L'OA est une maladie non seulement du cartilage mais de tous les tissus qui l'entourent. Au cours de la progression de cette maladie, la dégradation du cartilage est souvent accompagnée par un déséquilibre du remodelage osseux, une inflammation plus au moins importante de la membrane synoviale ainsi qu'une faiblesse des ligaments et des

muscles qui soutiennent l'articulation. Ces événements entraînent une instabilité lors des mouvements articulaires (Figure 6), (Hunter, 2011; Brandt et al., 2006; Henter et Felson, 2006).

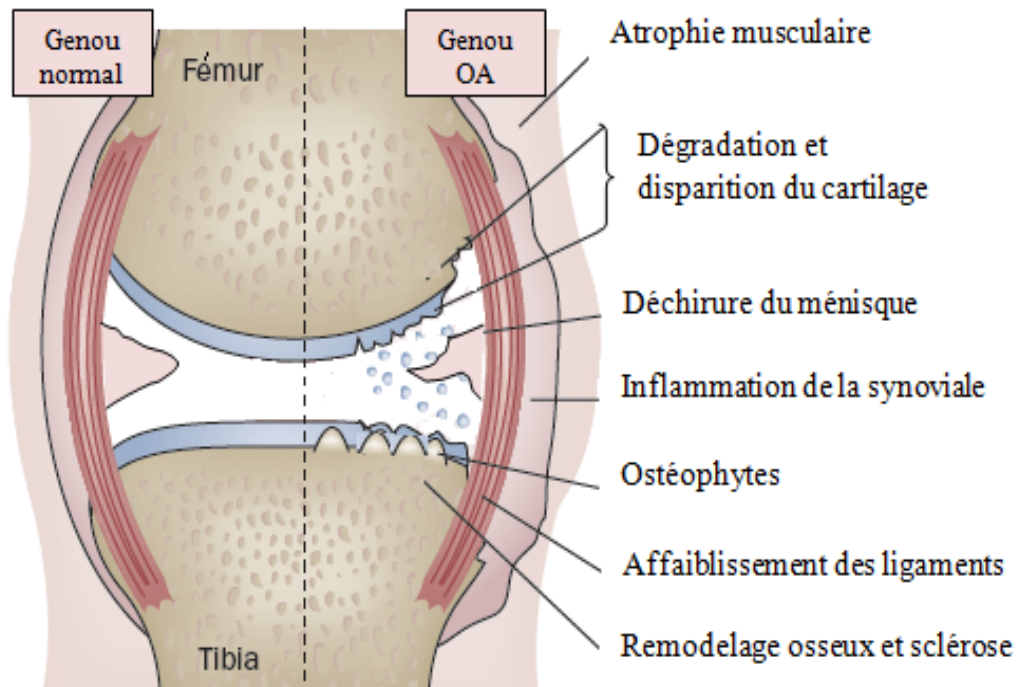


Figure 6: Structures articulaires touchées au cours de la maladie d'OA. Comparaison entre un genou normal et un genou arthrosique (Adapté de (Henter, 2011)).

I.C.1.1 Cartilage arthrosique

La dégradation du cartilage est la principale caractéristique de la maladie d'OA. Elle est associée à un déséquilibre dans l'homéostasie des composants qui constituent la matrice extracellulaire. Au fil du temps, ces perturbations aboutissent à la disparition complète du cartilage des surfaces articulaires. À ce stade, le remplacement du genou reste le seul moyen pour que le malade retrouve une vie normale (Figure 7).

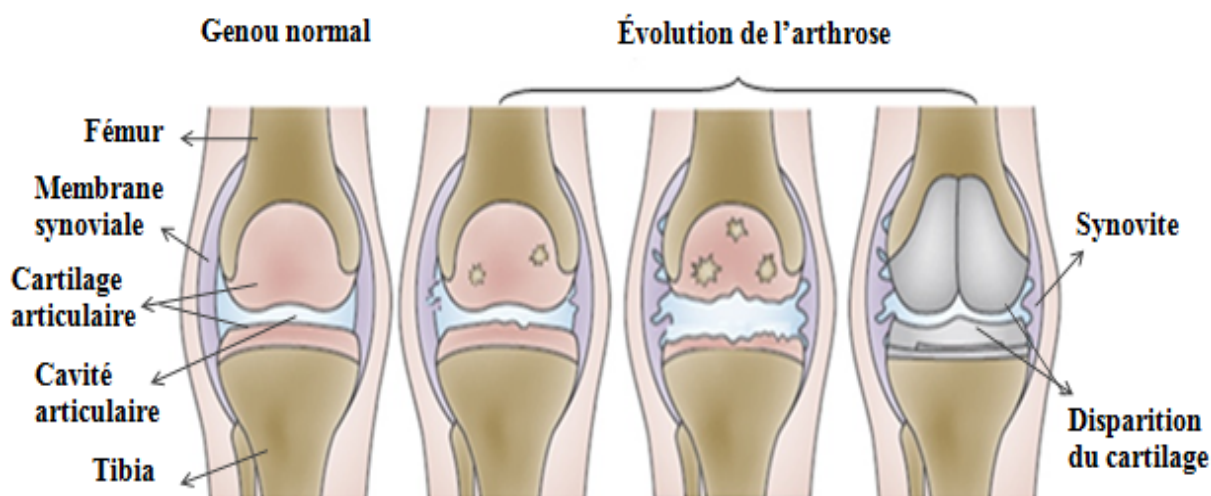


Figure 7: Étape de l'évolution de l'arthrose au niveau du genou. Le développement de l'OA se fait de façon progressive passant d'une OA légère à une OA avancée (Adapté de (Cicuttini et Wluka, 2014)).

I.C.1.1.1 Déséquilibre de l'homéostasie du cartilage

Dans un cartilage normal, les chondrocytes assurent le maintien de l'intégrité tissulaire en assurant à eux seuls l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des différents constituants de la matrice extracellulaire, et ceci grâce à des propriétés à la fois anaboliques et cataboliques. Les chondrocytes adaptent leur métabolisme en fonction de différentes cytokines et facteurs de croissance présents dans le milieu environnant ainsi que les charges mécaniques appliquées sur le cartilage articulaire lors des activités quotidiennes (Goldring, 2000; Martin et Buckwalter, 2000; Corvol, 2000). Au cours du développement de l'OA, le cartilage articulaire subit différents changements que ce soit au niveau morphologique ou moléculaire. Il perd son aspect lisse et brillant, il prend une couleur jaunâtre ou brunâtre, et donc devient moins transparent comparativement à un cartilage normal. Avec la progression de cette maladie, il se fissure, se dégrade et finit par disparaître sur certaines zones mettant à nu l'os sous-chondral, ce qui accentue plus l'intensité de la douleur au niveau du genou touché par cette pathologie (Laadhar et al., 2007; Ishiguro et al., 2002).

I.C.1.1.2 Dégradation du cartilage

Généralement, on peut distinguer trois grandes étapes dans l'évolution de cette maladie. La première étape se caractérise par des changements structuraux impliquant l'organisation architecturale des constituants majeurs de la matrice extracellulaire tels que l'eau, le collagène et le protéoglycane (Horton et al., 2006; Aigner et McKenna, 2002). En effet, suite à une première agression, on assiste à une prolifération des chondrocytes qui tentent de limiter et réparer les lésions induites. Ces cellules augmentent leurs activités anaboliques afin d'assurer une forte synthèse des constituants de la matrice extracellulaire (Gomez-Camarillo et Kouri, 2005; Rothwell et Bentley, 1973). Au début, la quantité du collagène de type II est maintenue. Cependant, ce type de collagène est rapidement remplacé par le type I (néocollagène) dont les propriétés biomécaniques sont de moindre qualité que le collagène de type II (Aigner et Dudhia, 1997; Klaus Von et al., 1977). Aussi, on note une défaillance dans la synthèse des protéoglycanes qui se lient moins bien à l'acide hyaluronique (Inerot et Heinegard, 1978). Les nouvelles molécules de protéoglycanes produites se caractérisent par une taille plus petite, une quantité élevée des chaînes de kératane sulphate par rapport aux chaînes de chondroïtine sulphate, et donc une faible teneur en eau (Laadhar et al., 2007; Inerot et Heinegard, 1978). Ces changements perturbent l'organisation structurale du cartilage qui se traduit par la diminution de sa résistance aux contraintes mécaniques (Corvo, 2000). Au terme de ce stade, ces tentatives de réparation aboutissent à la formation aux marges de l'articulation des excroissances osseuses, appelées ostéophytes (Hashimoto et al., 2002; Williams et Thonar, 1989).

La deuxième étape de la progression de cette maladie se caractérise par l'apparition des fibrillations au niveau de la surface du cartilage à cause de la fragilité de celui-ci. Les chondrocytes deviennent hypertrophiques et augmentent leurs pouvoirs cataboliques qui dominent, provoquant un déséquilibre entre la synthèse des enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs. Ces cellules vont synthétiser une quantité élevée des enzymes protéolytiques comme les métalloprotéases et les agrécánases responsables de la dégradation des constituants du cartilage et aussi, produire des médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines, les radicaux libres, les prostaglandines, ce qui accélèrent la progression de la maladie (van der

Kraan et van den Berg, 2012; Pitsillides et Beier, 2011). Généralement, la quantité des chondrocytes diminue progressivement, et ce qui reste des cellules se regroupent en amas autour des régions affectées transformant les fibrillations en fissures de taille plus grande qui finissent par se dégrader et relâcher dans la cavité articulaire (Zamli et Sharif, 2011). Parallèlement, l'os sous-chondral subit un remodelage osseux excessif qui s'accompagne par l'augmentation de la taille et la quantité des ostéophytes autour de l'articulation. Ces derniers, provoquent une gêne ainsi qu'une déstabilisation mécanique du genou (Burr et Gallant, 2012).

Au cours de la dernière étape, les fragments du cartilage libérés dans la cavité articulaire provoquent l'inflammation de la membrane synoviale. Les médiateurs libérés par celle-ci, accentuent la dégradation du cartilage provoquant une atteinte des couches plus profondes (Benito et al., 2005). En même temps, les chondrocytes hypertrophiés synthétisent des composants qui sont spécifiques comme le collagène de type X et la phosphatase alcaline qui permettent la calcification du cartilage, et des facteurs angiogéniques dont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) responsable de la formation et le recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins qui envahissent le cartilage articulaire (Ashraf et Walsh, 2008; Von der Mark et al., 1992; Stephens et al., 1992). À ce stade, les cellules vont s'épuiser, dégénérer et mourir par apoptose, laissant des zones acellulaires qui finissent par disparaître mettant à nu l'os sous-chondral (Laadhar et al., 2007; Setton et al., 1999).

I.C.1.2 Inflammation de la membrane synoviale

Depuis longtemps, l'OA est considérée comme une maladie non inflammatoire. L'inflammation de la membrane synoviale semblerait plutôt une caractéristique d'autres pathologies comme l'arthrite rhumatoïde (De Lange-Brokaar et al., 2012). L'origine de la synovite au cours de l'OA est encore mal connue. Cependant, des fragments du cartilage dégradé peuvent être retrouvés dans le liquide synovial, et donc leur contact avec la membrane synoviale pourrait avoir un rôle dans l'inflammation de celle-ci (Attur et al., 2010; Bonnet et Walsh, 2005; Myers et al., 1992). Suite à cette activation, la membrane synoviale induit la production de différents médiateurs responsables de la progression de cette maladie. Des études ont affirmé que 50% des personnes arthrosiques présentent une synovite (Attur et

al., 2010; Myers et al., 1990). En plus, les résultats d'IRM ont montré que l'augmentation de l'épaisseur du tissu synovial est observée chez 73% des patients avec une OA précoce (Bonnet et Walsh, 2005). Selon Benito, et al., les analyses immunohistochimiques ont confirmé que la membrane synoviale des patients arthrosiques montre une infiltration de macrophages, de cellules lymphocytaires, une production de facteurs cataboliques et angiogéniques ainsi que différentes cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 β et le TNF- α restent les plus répondues (Benito et al., 2005; Revell et al., 1988; Rollin et al., 2008). L'ensemble de ces médiateurs produits participent conjointement à la dégradation du cartilage articulaire. Néanmoins, l'inflammation de la membrane synoviale dans les genoux arthrosiques reste moins importante que celle observée au cours de l'arthrite rhumatoïde, mais beaucoup plus prononcée comparativement aux genoux sains (De Lange-Brokaar et al., 2012).

Enfin, plusieurs études ont affirmé l'importance de la membrane synoviale dans la pathologie de l'OA. Cependant, l'inflammation du tissu synovial semblerait loin d'être le premier mécanisme déclencheur de la dégradation du cartilage articulaire, puisque pas toutes les personnes arthrosiques présentent cette inflammation. De ce fait, d'autres études sont nécessaires pour éclaircir son implication dans cette maladie.

I.C.1.3 Remodelage osseux

L'implication de l'os sous-chondral dans la pathogenèse de l'OA a suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières années. Plusieurs travaux ont été effectués dont le but d'éclaircir le rôle de ce tissu dans l'initiation et la progression de cette maladie.

I.C.1.3.1 Changements structuraux osseux

Au cours de l'OA, l'os subi plusieurs modifications structurales qui altèrent ses propriétés mécaniques. Ces changements reflètent un déséquilibre dans le processus formation/destruction de ce tissu. Les examens radiographiques montrent l'apparition d'ostéophytes autour de l'articulation atteinte ainsi qu'une condensation de l'os sous-chondral (Buckland-Wright, 2004). Certains auteurs supportent l'hypothèse que ces modifications sont causées par la dégénérescence du cartilage articulaire alors que d'autres affirment qu'elles se manifestent avant le début de la destruction du cartilage, et qu'elles jouent un rôle dans

l'initiation et la progression de cette maladie (Bonnet et Walsh, 2005; Rogers et al., 2004; Panula et al., 1998, Radin et al., 1970).

Le rôle de l'os sous-chondral dans l'OA a fait l'objet de plusieurs études cliniques et expérimentales. Chez l'humain, certaines études ont rapporté qu'au cours de la maladie d'OA, on assiste à une augmentation de la densité minérale osseuse (BMD), du volume trabéculaire osseux, de l'épaisseur des trabécules ainsi que celle de la plaque sous-chondrale (Ding et al., 2003; Bobinac et al., 2003; Buckland-Wright, 1996). Alors que d'autres études ont montré une épaisseur plus faible des trabécules et moins de volume osseux trabéculaire chez les personnes affectées par cette maladie (Messent et al., 2005; Patel et al., 2003). La majorité des études cliniques sont faites chez des patients avec des symptômes d'OA intermédiaires à avancés. De ce fait, l'étude du rôle de l'os sous-chondral dans l'initiation et la progression de la maladie chez les humains reste difficile à déterminer (Sniekers et al., 2008).

Pour faire une évaluation chronologique des événements qui surviennent au cours de l'évolution de cette maladie, des travaux ont été effectués sur des modèles animaux comme le chien, le lapin et la souris, soit de manière spontanée, par section du ligament croisé antérieur ou par méniscectomie (Cohen-Solal et al., 2013). Certains chercheurs ont trouvé une diminution du volume osseux, de l'épaisseur des trabécules ainsi que celle de la plaque sous-chondrale alors que d'autres ont conclu que ces paramètres augmentent (Sniekers et al., 2008; Pelletier et al., 2004; Byoung Ju et al., 2013; Ding et al., 2006). L'ensemble de ces différences peuvent être expliquées par le type du modèle utilisé et le moment pendant lequel les mesures ont été effectuées (Sniekers et al., 2008). En effet, plusieurs études ont rapporté que l'os sous-chondral subit un remodelage osseux intense au cours de cette pathologie, impliquant des phases de résorption durant les premiers stades de la maladie et des phases de formation osseuse plus tardives qui aboutissent à son durcissement (Batiste et al., 2004; Boyd et al., 2000).

L'augmentation de la rigidité de l'os sous-chondral au cours de cette maladie affaiblit sa propriété absorbante des chocs mécaniques subis par l'articulation. Des études ont montré que cette rigidité est liée à l'augmentation des composants organiques osseux et non pas la BMD. En effet, la production du collagène de type I est augmentée au cours de l'OA (Mansell

et Bailey, 1998). En plus, chez les personnes arthrosiques, la composition de cette protéine est modifiée, on note une quantité plus élevée des chaînes $\alpha 1$ par rapport aux chaînes $\alpha 2$ entraînant une faible capacité d'assemblage des fibrilles du collagène en fibre (Bailey et al., 2002). Cette structure favorise l'altération du réseau de collagène, ce qui pourrait expliquer l'hypominéralisation de l'os sous-chondral chez les personnes arthrosiques (Couchourel et al., 2009; Li et Aspden, 1997).

I.C.1.3.2 Altérations métaboliques osseuses

L'os est un tissu actif capable de produire plusieurs facteurs de croissance et cytokines pour réguler son processus de formation et destruction. Au cours de l'OA, on assiste à un déséquilibre dans la production de ces médiateurs (Canalis et al., 1991). Parmi les facteurs de croissance, on retrouve le facteur de croissance analogues à l'insuline (IGF) et le facteur de croissance transformants β (TFG- β) (Marie, 2001). Des études ont montré une expression élevée de ces facteurs dans le tissu osseux arthrosique comparativement au normal. IGF joue plusieurs rôles importants dans le tissu osseux comme la différenciation des ostéoblastes, la formation osseuse en stimulant la production du collagène de type I et la résorption osseuse en diminuant l'expression des métalloprotéinases (Massicotte et al., 2006; Martel-Pelletier et al., 1998). Pour le TGF- β , il s'est avéré que son inhibition a pu corriger le déséquilibre du ratio des chaînes $\alpha 1/\alpha 2$ du collagène de type I observé au cours de cette maladie ainsi qu'améliorer la minéralisation osseuse (Couchourel et al., 2009).

Pour ce qui concerne les cytokines et les eicosanoïdes, des chercheurs de notre unité ont étudié le profil de leur expression dans le tissu osseux au cours de cette maladie. L'IL-1 β , l'IL-6, la prostaglandine E2 (PGE2) et le leucotriène B4 (LTB4) seraient les plus impliqués dans la régulation du remodelage osseux (Lajeunesse et Reboul, 2007). D'après Massicotte et al., la différence de l'expression de l'IL-6 et la PGE2 sépare les personnes arthrosiques en deux catégories: des patients avec une faible production d'IL-6 et de la PGE2 et autres avec une forte production de ces deux facteurs (Massicotte et al., 2002). Le niveau de la PGE2 corrèle inversement avec la production du LTB4 (Paredes et al., 2002). En effet, la PGE2 est impliquée dans la formation osseuse alors que le LTB4 stimule la différenciation des ostéoclastes, et donc la résorption osseuse (Li et al., 2007; Gallwitz et al., 1993). Aussi,

l'altération de la production de l'IL-1 β et l'IL-6 par les cellules osseuses au cours de l'OA favorise la dégradation de la matrice osseuse en stimulant la production des médiateurs cataboliques (Lajeunesse et Reboul, 2007; Kenichiro et al., 1998).

I.C.2 Médiateurs impliqués dans l'arthrose

Le déséquilibre de l'homéostasie du cartilage observé au cours de la maladie d'OA résulte d'une production anormale de différents médiateurs chimiques par les tissus articulaires. Ces médiateurs regroupent des facteurs cataboliques et des cytokines pro-inflammatoires responsables de la dégradation du cartilage articulaire.

I.C.2.1 Facteurs cataboliques

Au cours de l'OA, la dégradation du cartilage est assurée par différentes protéases: les métalloprotéases matricielles (MMPs), les "disintegrin and a metalloprotease with thrombospondin motifs" (ADAMTs), les protéases à sérine et les protéases à cystéine (Martel-Pelletier et al., 2001).

I.C.2.1.1 Métalloprotéases (MMPs)

La famille des MMPs sont des protéases représentées par différents groupes d'enzymes: les matrilysines, les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les MMPs de type membranaires et autres. L'activité protéolytique de ces enzymes fut décrite la première fois en 1962 par Gross et Lapière (Gross et Lapière, 1962). Les MMPs partagent une structure commune constituée de trois principaux domaines: pré-domaine, pro-domaine et domaine catalytique. Le pré-domaine en position N-terminale assure le transport de ces protéases à la surface membranaire. Par la suite vient le pro-domaine, son rôle consiste à maintenir l'enzyme sous forme inactive. Il est constitué d'une séquence peptidique de 80 à 90 acides aminés renfermant un résidu cystéine qui interagit avec l'atome de zinc du domaine catalytique formant ainsi une structure peptidique tridimensionnelle. Le clivage du pro-domaine entraîne l'activation de l'enzyme en libérant l'atome de zinc du site catalytique qui devient accessible au substrat. La plupart des MMPs contient un quatrième domaine homologue de l'hémopexine. On le retrouve chez les collagénases et les gélatinases. Il sert

comme un site de liaison des inhibiteurs des MMPs et intervient dans l'interaction de ces enzymes avec leurs substrats. La combinaison de ce domaine avec le domaine catalytique est indispensable pour le clivage de la triple hélice du collagène native (Martel-Pelletier et al., 2001; Massova et al., 1998; Nagase, 1997).

Le clivage protéolytique du collagène fibrillaire est assuré en premier par le deuxième groupe des MMPs, les collagénases interstitielles. L'activité catalytique de ces protéases génère des fragments de trois quart et un quart de longueur. Ces derniers deviennent des substrats pour les autres groupes de protéases qui sont incapables de cliver le collagène sous sa forme native (Billinghurst et al., 1997; Wu et al., 1991).

Le groupe des collagénases interstitielles est constitué de la MMP-1, la MMP-8 et la MMP-13. L'augmentation de la production des médiateurs inflammatoires au cours de la maladie d'OA stimule la production de ces protéases. En effet, des études ont démontré que ces protéases sont exprimées par les chondrocytes dans le cartilage arthrosique et sont régulées à la hausse en présence de l'IL-1 β (Martel-Pelletier et al., 2001; Woessner, 1991). La MMP-1, la MMP-8 et la MMP-13 ont une affinité élevée pour le collagène de type III, I et II, respectivement (Knäuper et al., 1996; Hasty et al., 1987; Welgus et al., 1981). Néanmoins, l'activité catalytique de ces protéases n'est pas limitée à ces types de collagène, car ils peuvent agir sur d'autres types de substrats (Tableau 2), (Davidson et al., 2006; Ishiguro et al., 2002).

Knäuper et al., ont démontré que la MMP-13 a une affinité élevée au collagène de type II (Knäuper et al., 1996). Cette protéase possède une activité catalytique dix fois plus importante pour ce type de collagène par rapport à la MMP-1 (Mitchell et al., 1996). Cette dernière est plus active sur le collagène de type III. Néanmoins, cette affinité dépend de l'origine du collagène étudié. Welgus et al., ont trouvé que l'activité catalytique de la MMP-1 sur le collagène de type I et III humains est supérieure à celle du cochon d'inde (Welgus et al., 1981). Aussi, Nagase et Visse ont démontré que la MMP-13 présente une affinité de clivage similaire pour le collagène de type I et II de différents modèles animaux (Nagase et Visse, 2011).

Le rôle de la MMP-13 dans cette pathologie a été étudié dans des expériences *in vivo*. L'utilisation des souris déficientes en MMP-13 a permis de diminuer l'érosion du cartilage articulaire chez ces souris par rapport aux sauvages (Little et al., 2009). Par ailleurs, des travaux ont conclu qu'au cours de cette maladie, il existe un déséquilibre dans la production de ces protéases et leurs inhibiteurs (Dean et al., 1989). En effet, les inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMPs) sont au nombre de quatre, TIMP-1-4 (Baker et al., 2002; Brew et al., 2000). Le TIMP-1,-2,-3 sont synthétisés par les cellules du cartilage. Contrairement au TIMP-2, le TIMP-1 et le TIMP-3 sont induits par des facteurs inflammatoires comme le facteur de croissance transformants β (TGF- β), ce qui pourrait expliquer l'augmentation de leur expression dans le cartilage arthrosique (Davidson et al., 2006; Martel-Pelletier et al., 2001; Su et al., 1999). En outre, l'activité protéolytique des MMPs dépasse le niveau de production des TIMPs dans les conditions arthrosiques, ce qui favorise la dégradation du cartilage articulaire par les MMPs (Dean et al., 1989; Dean et al., 1987).

Les autres groupes de MMPs sont impliqués aussi dans la protéolyse d'une variété de composants. Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) assurent la dégradation du collagène fibrillaire dénaturé par les collagénases (Galasso et al., 2012; Chantrain et DeClerck, 2002). Alors que les stromélysines (MMP-3 et MMP-10), agissent plus sur l'activation des pro-collagénases interstitielles (Barksby et al., 2006; Knäuper et al., 1993; Murphy et al., 1987). Aussi, ces deux groupes de protéases ont des effets sur plusieurs types de collagènes (IV, V, VII, X, and XI), la gélatine, le protéoglycane, la fibronectine et autres (Ishiguro et al., 2002). Pour les MMPs membranaires (MMP-14, MMP-15 MMP-16, MMP-17), le rôle des enzymes appartenant à ce groupe n'est pas encore bien étudié. Néanmoins, des travaux confirment que la MMP-14 assure la dégradation du collagène de type I, II, III, la gélatine et le protéoglycane ainsi que l'activation de la pro-MMP-2 et la pro-MMP-13, deux enzymes fortement exprimées dans le cartilage arthrosique, et qui jouent un rôle important dans sa dégradation (Ohuchi et al., 1997; Imai, 1997; Knäuper et al., 1996).

Tableau 2: Classification des MMPs (Adapté de (Davidson et al., 2006; Ishiguro et al., 2002).

MMPs	Enzymes	Substrats
1-Collagénases MMP-1 MMP-8 MMP-13 MMP-18 *	Collagénase 1 Collagénase 2 Collagénase 3 Collagénase 4	Collagène I, II, III, VIII, X Collagène I, II, IIIa, X Collagène I, II, III, X Collagène I, Gélatine
2-Gélatinases MMP-2 MMP-9	Gélatinase A Gélatinase B	Collagène dénaturé, Collagène IV, V, VII Collagène dénaturé, Collagène IV, V, VII, Élastine
3- Stromélysines MMP-3 MMP-10 MMP-11	Stromélysine 1 Stromélysine 2 Stromélysine 3	Protéoglycane, Collagène IX, IV, VII, Fibronectine, Gélatine, Laminine Protéoglycane, Collagène III, IV, VII, Fibronectine, Gélatine Protéoglycane, Fibronectine, Élastine
3-MMPs membranaires MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25 *	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP MT5-MMP MT6-MMP	Gélatine, Collagène I, II, III, Protéoglycane, Fibronectine, Vitronectine, Laminine Gélatine, Collagène I, III, Protéoglycane, Fibronectine, Laminine Gélatine, Collagène I, II, III, Protéoglycane, Fibronectine, Vitronectine, Laminine - Protéoglycane Gélatine
4-Autres MMPs: MMP-7 MMP-12 MMP-19 MMP-20 * MMP-22 * MMP-23 MMP-26 * MMP-28	Matrilysine Métalloélastase RASI-1 Énamélysine C-MMP - Matrilysine-2 -	Protéoglycane, Type IX, IV, VII, Collagène, Fibronectine, Gélatine, Laminine, Élastine Élastine, Fibronectine Protéoglycane Amélogénine Collagène I, Caséine, Gélatine Gélatine Collagène IV, Fibronectine, Gélatine -

* MMPs non détectées au niveau du cartilage articulaire

I.C.2.1.2 ADAMTs

En plus du collagène, l'aggrécane rentre aussi dans la composition de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire. Sa dégradation représente une caractéristique du cartilage arthrosique, car des fragments de l'aggrécane ont été détectés dans le liquide synovial des personnes malades (Lohmander et al., 1993 ; Sandy et al., 1992). Le groupe des ADAMTs est constitué de 19 membres dont huit d'entre eux ont été impliqués dans la dégradation du protéoglycane comme ADAMPT-1, ADAMPT-4, ADAMPT-5, ADAMPT-8 et ADAMPT-9. Ils sont capables de cliver l'aggrécane sur des sites différents de celles des MMPs. En effet, l'aggrécane est formé de trois domaines globulaires: G1, G2 et G3 au niveau desquels les aggrecanases peuvent agir. Cependant, le domaine interglobulaire G1-G2 est la région qui représente les deux sites majeurs pour la dégradation de l'aggrécane: Asn341–Phe342 et Glu373–Ala37 pour la plupart des MMPs et des ADAMTs, respectivement (Stanton et al., 2011; Verma et Dalal, 2011; Porter et al., 2005; Nagase et Kashiwagi, 2003).

ADAMT-4 et ADAMT-5, représentent une activité protéolytique importante par rapport aux autres protéases. Elles sont considérées comme des acteurs clés dans l'altération de la matrice extracellulaire (Verma et Dalal, 2011; Gendron et al., 2007; Kashiwagi et al., 2004). *In vitro*, le blocage de ces enzymes par des agents chimiques ou bien des siRNA a permis de réduire la génération des fragments d'aggrécane (Song et al., 2007; Malfait et al., 2002; Tortorella et al., 2001). *In vivo*, des souris déficientes en ADAMT-5 dont l'OA a été induite expérimentalement n'ont pas développé des lésions cartilagineuses majeures en comparaison avec les souris sauvages (Majumdar et al., 2007; Glasson et al., 2005). Ceci suggère le rôle important de l'ADAMT-5 dans la dégradation du cartilage articulaire murin. Cependant, des questions demeurent sur la contribution de ces deux enzymes dans l'altération du cartilage humain *in vivo*. L'identification des inhibiteurs sélectifs pour ces aggrecanases pourrait confirmer le rôle de ces enzymes dans la dégradation du cartilage arthrosique humain.

I.C.2.1.3 Protéases à sérine

Ce groupe d'enzymes est impliqué aussi dans le développement de l'OA. Parmi les protéases à sérines, on retrouve les activateurs du plasminogène (PA) qui sont responsables de la transformation du plasminogène en plasmine (Hart et Rehemtulla, 1988). Les protéases à sérine peuvent être de type tissulaire ou urokinase. Ce dernier type reste le plus abondant dans le tissu articulaire arthrosique (Serni, 1995; Martel-Pelletier et al., 1991). Plusieurs études ont démontré le rôle de la plasmine dans l'altération du cartilage articulaire. Mochan et Keler ont affirmé que la dégradation du protéoglycane est proportionnelle à la concentration de la plasmine utilisée (Mochan et Keler, 1984). En plus, celle-ci est impliquée aussi dans l'activation des pro-MMPs au cours de l'OA, notamment les collagénases (Collier et Ghosh, 1988). La régulation de l'activation du système enzymatique plasminogène/plasmine est contrôlée par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (PAI-1) dont le niveau d'expression est diminué dans le cartilage arthrosique. Par ailleurs, il existe une corrélation positive entre le niveau de production des MMPs actives et la plasmine. Cela pourrait confirmer la contribution de ces protéases dans la destruction du cartilage arthrosique (Martel-Pelletier et al., 1991).

I.C.2.1.4 Protéases à cystéine

Les protéases à cystéine regroupent plusieurs enzymes impliquées dans les événements cataboliques rencontrés au cours de l'OA. Parmi ces protéases, on retrouve la cathepsine B, K et L (Morko et al., 2004). Les produits de dégradation des composants de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire jouent un rôle important dans l'augmentation de l'expression et l'activation de ce groupe d'enzymes (Ruetger et al., 2008). Une fois activées, elles vont contribuer à leur tour à la dégradation des constituants du cartilage, par exemple le protéoglycane et le collagène (Maciewicz et al., 1990 ; Roughley et Barrett, 1977). Elles agissent soit directement sur ces composants ou bien via l'activation des pro-MMPs (Eeckhout et Vaes, 1977). L'activité protéolytique des cathepsines est régulée par des inhibiteurs des protéases à cystéine dont l'activité semble diminuée, plus spécifiquement dans des explants du cartilage avec des lésions sévères, comparativement aux contrôles et ceux avec des lésions modérées (Martel-Pelletier et al., 1990). Donc, en plus des autres enzymes

citées auparavant, les protéases à cystéine jouent aussi un rôle important dans le développement de cette maladie.

I.C.2.2 Facteurs anaboliques

Plusieurs études ont été réalisées pour l'identification des facteurs anaboliques responsables de la stabilité de l'équilibre physiologique des tissus articulaires. Les facteurs de croissance sont des polypeptides biologiquement actifs. La plupart d'entre eux ont été considérés comme des médiateurs importants dans le développement et le maintien de l'homéostasie du cartilage articulaire. Parmi ces facteurs de croissance: le facteur de croissance transformants β (TGF- β), les protéines osseuses morphogénétiques (BMPs), les facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGFs) et les facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs) sont les plus importants dans cette maladie.

TGF- β

Le TGF- β joue un rôle important dans la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire (Van Beuningen et al., 1994; Redini et al., 1988). Le niveau d'expression du TGF- β est élevé au début de développement de cette maladie, et il diminue au fur et à mesure que la maladie progresse (Blaney Davidson et al., 2006; Van der Kraan et al., 1997). Aussi, la production de ce facteur est âge dépendante. Blaney Davidson et al., ont démontré une faible production de ce facteur ainsi qu'une diminution de l'expression de son récepteur par les chondrocytes dans le cartilage des souris âgées (Blaney Davidson et al., 2005).

Par ailleurs, TGF- β est impliqué dans la production des TIMPs au niveau du cartilage arthrosique et dans l'inhibition des MMPs (Hui et al., 2001; Edwards et al., 1987). En plus, ce facteur semble contrarier l'effet de l'IL-1 β dans l'inhibition de la biosynthèse du protéoglycane en diminuant l'expression du récepteur de cette cytokine dans le cartilage articulaire (Refini et al., 1993). Dans différents modèles animaux, l'injection de TGF- β dans l'articulation du genou a un effet différent selon le tissu articulaire. Au niveau du cartilage, elle favorise la réparation des lésions cartilagineuses et l'augmentation de la synthèse des protéoglycanes alors qu'au niveau de la membrane synoviale, elle provoque le développement

d'une fibrose synoviale (Blaney Davidson et al., 2007; Bakker et al., 2001). Aussi, il s'est avéré que dans les premiers stades de la maladie, ce facteur est impliqué dans la formation des ostéophytes. Cependant, l'expression de TGF- β diminue au cours de la progression de la maladie, et donc d'autres médiateurs sont impliqués dans la progression de la formation de ces excroissances osseuses. Parmi ces derniers, on retrouve un autre membre de la famille des facteurs de croissance, la BMP-2 dont l'expression augmente au cours de la progression de cette pathologie (Blaney Davidson et al., 2006).

BMPs

Les BMPs jouent un rôle important dans la stimulation de la formation osseuse, la croissance des chondrocytes ainsi que la synthèse des constituants du cartilage. Plusieurs membres du groupe de BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9 et BMP-13) ont été détectés au niveau du cartilage articulaire (Martel-Pelletier et al., 2008). Le niveau d'expression de certains de ces facteurs change au cours de l'OA (BMP-2, BMP-7) alors que celui d'autres ne varie pas comparativement aux tissus normaux (Fukui et al., 2003; Merrihew et al., 2003; Bobacz et al., 2003). La BMP-2 et la BMP-7 sont les plus impliquées dans cette maladie. Les autres membres de BMPs possèdent aussi un effet anabolique. Cependant, le rôle de ces facteurs dans le cartilage arthrosique n'est pas encore bien étudié.

La BMP-2 semble être régulée à la hausse dans le cartilage arthrosique par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α . Elle induit l'expression du collagène de type II dans le cartilage ainsi que la formation des ostéophytes. Ces derniers sont localisés dans des régions différentes que ceux induits par TGF- β (Fukui et al., 2003; Van Beuningen et al., 1998). Contrairement à la BMP-2, la BMP-7 n'est pas impliquée dans la formation des ostéophytes (Hayashi et al., 2008). Par contre, elle semble avoir un effet à la fois anabolique et anti-catabolique (Chubinskaya et al., 2008). La BMP-7 est un puissant stimulateur de la synthèse des constituants de la matrice, notamment le collagène de type II, le protéoglycane et la fibronectine (Chubinskaya et al., 2008; Flechtenmacher et al., 1996). Aussi, elle antagonise l'effet des cytokines pro-inflammatoires responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire en diminuant l'expression des MMPs et les aggrecanases (Fortier et al.,

2011; Chubinskaya et al., 2008). Les effets de la BMP-7 sont potentialisés en présence d'un autre facteur anabolique, IGF-1 (Kim et al., 2010; Loeser et al., 2003).

IGFs

Les IGFs sont aussi des facteurs anaboliques, mais moins puissants que la BMP-7 (Loeser et al., 2003). Parmi ce groupe, IGF-1 est le plus impliqué dans le maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire (Luyten et al., 1988). L'expression de ce facteur semble augmenter dans le cartilage arthrosique afin de rétablir son homéostasie (Middleton et al., 1992). La fixation d'IGF-1 sur son récepteur réduit la production des MMPs et favorise l'expression du récepteur de type II de l'IL-1 β (IL1-RII), bloquant ainsi les effets de cette cytokine (Wang et al., 2003; Hui et al., 2001). Cependant, cette tentative de réparation ne semble pas suffisante pour corriger ce déséquilibre. L'impuissance d'IGF-1 est liée à la présence d'une protéine de liaison IGF (IGFBP), plus spécifiquement IGFBP-3, dont la production semble triplée dans le cartilage arthrosique et dépasse le niveau de production d'IGF-1 (Eviatar et al., 2003; Chevalier et Tyler, 1996; Fernihough et al., 1996). La liaison d'IGFBP à IGF-1 bloque sa fixation au récepteur empêchant la transmission du signal à l'intérieur de la cellule, ce qui diminue ces effets anaboliques. Enfin, De Ceuninck et al., ont montré que l'inhibition de la formation du complexe IGFBP/IGF-1 favorise la synthèse des protéoglycanes par les chondrocytes articulaires et protège la membrane synoviale de l'inflammation (Fortier et al., 2011; De Ceuninck et al., 2004).

FGFs

Les FGFs sont des polypeptides qui jouent un rôle physiologique important. Ils sont impliqués dans la réparation tissulaire, la différenciation cellulaire et le développement embryologique. La famille des FGFs comporte plusieurs membres tels que FGF-2, FGF-4, FGF-8, FGF-9, FGF-10 et FGF-18. La distribution de ces facteurs est différente d'un tissu à l'autre (Gospodarowicz et al., 1987; Yan et al., 2011 ; Li et al., 2012). Les FGFs exercent leurs fonctions par interaction avec des récepteurs à tyrosine kinase (Powers et al., 2000). La présence du sulfate d'héparine, un composé localisé dans la matrice extracellulaire du cartilage articulaire, semble nécessaire pour la stabilité du complexe FGF/FGFR (Otsuki et al., 2010).

L'interaction des FGFs avec leurs récepteurs n'est pas spécifique. Un même récepteur est capable de se lier à plusieurs facteurs, à leur tour, ces derniers peuvent se fixer sur différents récepteurs. Cette double redondance présente un système d'interaction complexe empêchant de définir de manière exacte le rôle de chaque facteur (Powers et al., 2000).

Parmi les membres de ces facteurs, le FGF-2 et le FGF-18 restent les plus étudiés dans l'OA (Martel-Pelletier et al., 2008; Mueller et al., 2011). Le rôle de FGF-2 dans le cartilage articulaire n'est pas encore bien défini (Ellman et al., 2013). La production de ce facteur dans le cartilage arthrosique est augmentée par rapport au normal (Orito et al., 2003). Sawaji et al., ont affirmé que FGF-2 est impliqué dans l'inhibition de l'expression des aggrecanases dans le cartilage articulaire (Sawaji et al., 2008). Ceci a été confirmé *in vivo* par l'utilisation des souris déficientes en FGF-2 avec OA induite. Le niveau de production d'ADAMT-5 est augmenté chez ces souris par rapport aux souris sauvages (Chia et al., 2009). D'autres études ont trouvé des résultats qui démontrent un rôle catabolique de ce facteur (Ellman et al., 2013). Le FGF-2 inhibe la synthèse des protéoglycanes induite par des facteurs anaboliques comme la BMP-7 et l'IGF-1. Il stimule la production des MMPs, particulièrement la MMP-13, la prolifération de la synoviale, l'angiogenèse ainsi que la formation des ostéophytes (Yan et al., 2011; Ashraf et al., 2010; Im et al., 2007; Jingush et al., 2006; Canalis et al., 1991). Cette différence pourrait être expliquée par le profil d'expression des récepteurs FGFs (FGFR) qui varie entre les espèces ainsi que les tissus. Le FGFR-1 et le FGFR-3 prédominent dans le cartilage humain normal alors que le FGFR-2 et le FGFR-4 sont plus présents dans le cartilage murin (Li et al., 2012; Yan et al., 2011).

Au niveau du cartilage arthrosique, l'expression de FGFR-1 est plus importante que celle de FGFR-3. La diminution de l'expression de FGFR-3 corrèle négativement avec la production des médiateurs arthrosiques. Donc, les effets cataboliques de FGF-2 au niveau du cartilage articulaire humain sont associés à l'activation de FGFR-1 (Ellman et al., 2013; Yan et al., 2011).

Chez la souris, la progression de l'OA est associée à la diminution de l'expression de la majorité des FGFR. L'injection intra-articulaire de FGF-2 produit un effet opposé à celui observé dans le cartilage humain, et donc une augmentation de l'expression de FGFR-3 (Yan

et al., 2011, Li et al., 2012). Aussi, l'utilisation des souris déficientes en FGFR-1 a permis la diminution de l'expression de la MMP-13 ainsi que la dégradation du cartilage articulaire (Weng et al., 2012). Donc, le FGFR-1 est plus impliqué dans des effets cataboliques alors que le FGFR-3 est plus anabolique. Ceci a été supporté par des travaux sur le facteur FGF-18 qui semble exercer ses effets spécifiquement via le FGFR-3. Plusieurs études ont confirmé le rôle anabolique de FGF-18. Des souris déficientes en FGF-18 ont présenté des malformations articulaires accompagnées par une dégradation précoce du cartilage articulaire. Le FGF-18 joue un rôle important dans la réparation du cartilage arthrosique en favorisant la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire. (Ellman et al., 2013; Moore et al., 2005).

I.C.2.3 Médiateurs pro-inflammatoires

Les cytokines semblent jouer un rôle important dans le processus de dégradation du cartilage. Elles sont générées par les différentes cellules des tissus articulaires. Il existe plusieurs cytokines impliquées dans le développement de cette maladie. Une fois produites, elles sont capables de perturber l'homéostasie du cartilage et stimuler la production d'autres médiateurs responsables de la progression de cette pathologie (Figure 8).

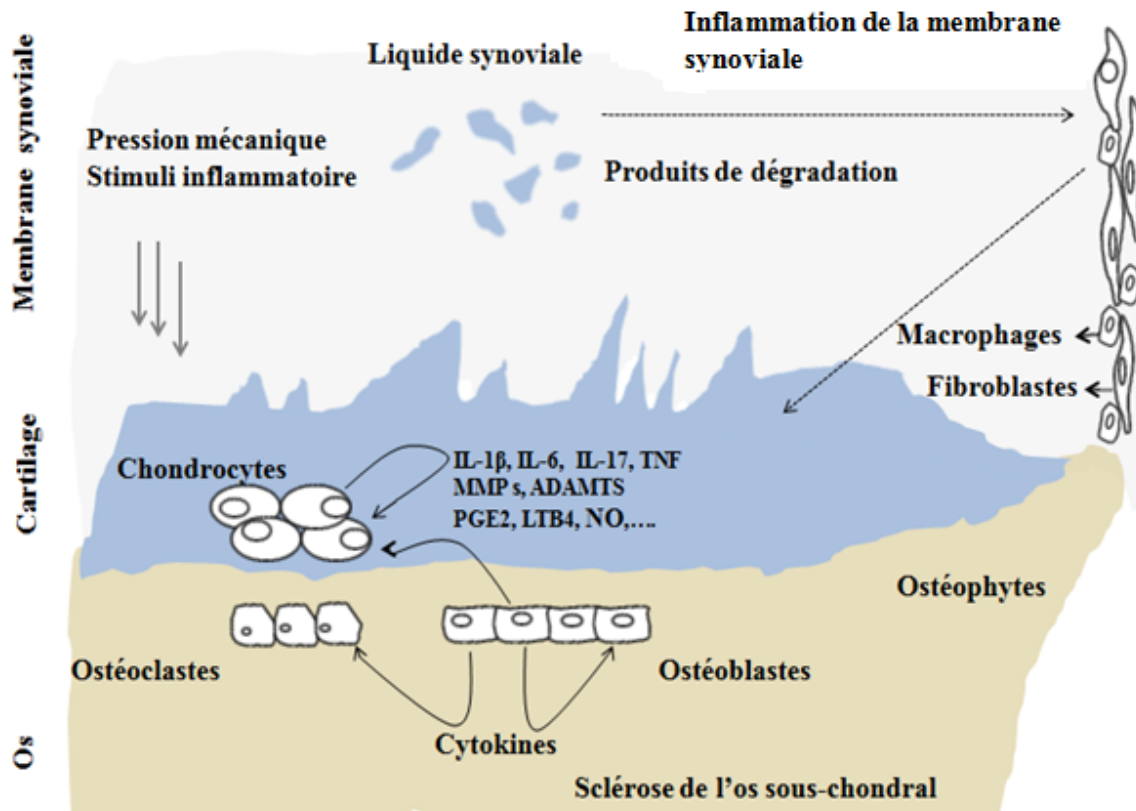


Figure 8: Médiateurs impliqués dans le développement de l'arthrose (Adapté de (Kapoor et al., 2011; Sellam et Berenbaum, 2010)).

I.C.2.3.1 Cytokines

L'IL-1 β et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) sont les principales cytokines pro-inflammatoires impliquées dans cette maladie. Elles sont hyperrégulées dans le cartilage arthrosique (Kapoor et al., 2011). IL-1 β est une cytokine produite sous forme d'un précurseur (pro-IL-1 β) dont l'activation nécessite un clivage protéolytique par une enzyme de conversion de l'IL-1 β appartenant à la famille des protéases à cystéine, la caspase 1 (Krumm et al., 2014; Dinarello, 2013; Thornberry et al., 1992). Une fois activée, cette cytokine peut se fixer sur deux types de récepteurs, type I (IL-1RI) et type II (IL-1RII) (Boraschi et Tagliabue, 2006). L'expression de l'IL-1RI est plus élevée dans le cartilage arthrosique comparativement au cartilage normal (Martel-Pelletier et al., 1992). La fixation de l'IL-1 β sur ce récepteur provoque la destruction des constituants de la matrice extracellulaire en stimulant la

production des médiateurs cataboliques comme les MMPs et les ADAMTs (Ahmad et al., 2009; Vincenti et Brinckerhoff, 2002). L'activité de cette cytokine est inhibée par la présence de son antagoniste (IL-1Ra). Sa fixation sur le récepteur de l'IL-1 β de type I (IL-1R1) réduit les événements cataboliques provoqués par cette cytokine au niveau du cartilage articulaire (Palmer et al., 2002; Ma et al., 1998). Un autre antagoniste de l'IL-1 β est son récepteur de type II (IL-1RII). L'activation de ce récepteur par l'IL-1 β n'entraîne pas la transmission du signal à l'intérieur de la cellule, ce qui diminue les effets médiés par l'IL-1 β . Dans l'OA, la dérégulation de la production de ces antagonistes pourrait favoriser les effets de l'IL-1 β (Attur et al., 2002; Attur et al., 2000).

Contrairement à l'IL-1 β , le TNF- α est plus impliqué dans les événements inflammatoires observés dans le cartilage articulaire (Kapoor et al., 2011; Joosten et al., 1999). Ceci a été démontré par des études *in vivo*. Il semble que l'inhibition de l'IL-1 β prévient la destruction du cartilage et protège l'os de l'érosion alors que celle de TNF- α réduit l'inflammation. Le TNF- α est produit par les mêmes cellules que l'IL-1 β , par exemple les chondrocytes, les cellules de la membrane synoviale et celles du tissu osseux (Bu et al., 2003; Moo et al., 2001; Brennan et al., 1992). Le TNF- α est sécrété sous forme d'un précurseur protéique dont l'activation est médiée par une protéase appartenant à la famille des adamalysine, enzyme de conversion du TNF- α (Gooz et al., 2010). Selon Patel, et al., celle-ci est régulée à la hausse dans le cartilage arthrosique humain comparativement au normal (Patel et al., 1998).

Pour exercer ses effets, le TNF- α se fixe sur deux types de récepteurs, TNF-R55 et TNF-R75, nommés selon leur poids moléculaire. À l'opposé de ceux de l'IL-1 β , les deux récepteurs de TNF- α sont capables de transmettre le signal à l'intérieur de la cellule (Locksley et al., 2001). Dans le cartilage arthrosique, le TNF-R55 semble avoir un rôle dominant dans la survenue des activités de TNF- α . Une expression élevée de ce récepteur a été constatée chez les chondrocytes et les fibroblastes synoviaux arthrosiques par rapport aux normaux (Alaaeddine et al., 1997; Westacott et al., 1994). Par ailleurs, le clivage protéolytique du domaine extracellulaire de chaque récepteur est à l'origine de la production des récepteurs solubles de TNF- α , TNF-sR55 et TNF-sR75 (Locksley et al., 2001). Les effets biologiques de

ces récepteurs solubles semblent être liés à leurs concentrations dans les tissus articulaires. Une faible production de ces derniers est capable de renforcer les activités de TNF- α en augmentant la durée de vie de cette cytokine par la stabilisation de sa conformation trimérique alors que dans le cas d'une forte production, ces récepteurs semblent jouer le rôle des protéines de liaison. En effet, ils sont capables de capter cette cytokine, ce qui empêche sa fixation sur son récepteur et donc d'en diminuer ces effets inflammatoires (Aderka et al., 1992).

L'activation de l'IL-1 β et le TNF- α stimule la production de différents médiateurs impliqués dans le développement et la progression dans cette maladie. Le traitement des chondrocytes par ces cytokines favorise la production de différents médiateurs tels que la PGE2, le NO, la COX-2, la PLA2, les MMPs et autres (Kapoor et al., 2011). Ceux-ci sont à l'origine des événements cataboliques et inflammatoires observés dans les articulations arthrosiques. En effet, les effets provoqués par l'IL-1 β et le TNF- α sont médiés par l'activation de différentes voies de signalisation dont les plus importantes sont les voies c-Jun N-terminal kinases (JNK), p38MAPK et NF- κ B (Figure 9). Par ailleurs, il existe des mécanismes moléculaires endogènes capables de diminuer les effets de ces deux cytokines dans les chondrocytes ainsi que diminuer la progression des lésions du cartilage dans différents modèles animaux arthrosiques (Kapoor et al., 2011; Dempsey et al., 2003; O'Neill et al., 1998).

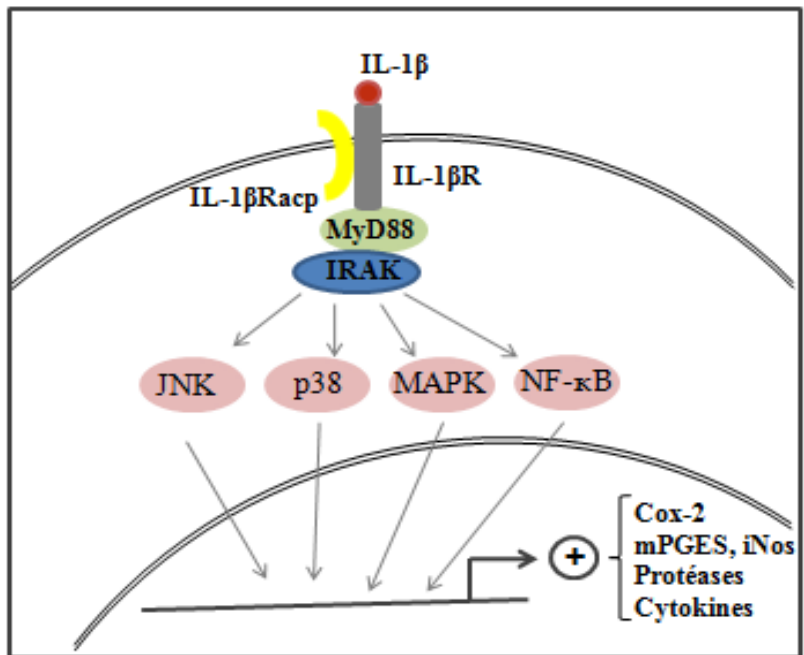


Figure 9: Mécanismes d'action de l'IL-1 β au niveau du cartilage arthrosique. La formation du complexe IL-1 β /IL-1 β R conduit à la liaison du corécepteur IL-1 β Racp. Après, IL-1 β R interagit avec la molécule adaptatrice MyD88, qui à son tour, lie une autre protéine nommée, IRAK. Celle-ci est à l'origine du recrutement d'un complexe de protéines kinases qui induisent différentes voies de signalisation (MAPK, NF-Kb, JNK, p38) via une série de phosphorylation. Les voies activées seront responsables de la transcription des gènes cataboliques cibles (Adapté de (Chevalier et al., 2013)).

En plus de L'IL-1 β et le TNF- α , d'autres cytokines contribuent aussi au développement de la maladie, par exemple IL-6, IL-15, IL-17, IL-18 et autres (Fernandes et al., 2002).

L'IL-6 est une cytokine produite aussi par les différentes cellules des tissus articulaires. Au cours de cette maladie, le niveau de production de cette cytokine augmente en réponse à la stimulation par l'IL-1 β et le TNF- α (Guerne et al., 1990). Il existe deux types de récepteurs de l'IL-6: le récepteur membranaire (mIL-6R) et le récepteur soluble (sIL-6R). Le sIL-6R est généré suite à un clivage protéolytique par la métalloprotéinase à zinc, ADAM-17 (Simpson et al., 1997). Le transfert du signal à l'intérieur de la cellule nécessite la fixation de la sous unité gp130, qui est à son tour présentée sous forme membranaire (m gp130) et soluble

(sgp130). La formation du complexe IL-6/IL-6R/sgp130 bloque la transmission du signal alors que la liaison de l'IL-6/IL-6R avec mgp130 favorise le transfert du signal, et par conséquent stimule les activités de l'IL-6 (Boulanger et al., 2003; Narazaki et al., 1993).

Le rôle de cette cytokine dans cette maladie reste encore controversé. *In vitro*, l'IL-6 inhibe la production des constituants de la matrice extracellulaire du cartilage, notamment le collagène et le protéoglycane. De même, elle est capable d'accentuer les effets de l'IL-1 β en augmentant la dégradation du protéoglycane (Porée et al., 2008; Guerne et al., 1999; Jikko et al., 1998). Cette dégradation est associée à l'augmentation de l'expression des aggrecanes (Flannery et al., 2000). Au niveau du tissu osseux, l'IL-6 déclenche la différenciation et l'activation des ostéoclastes responsables de la résorption osseuse (Kwan Tat et al., 2004; Kotake et al., 1996). D'un autre côté, des études ont montré que l'IL-6 n'est pas impliquée dans la synthèse des MMPs, mais elle est capable d'induire celle des TIMPs dans les chondrocytes. Cependant, le niveau de son production reste faible en comparaison avec la stimulation par d'autres cytokines (Silacci et al., 2005; Hauptmann et al., 1991).

In vivo, les souris déficientes en IL-6 ont tendance à développer une OA spontanée plus sévère que celle observée chez les souris sauvages. En plus, ces souris se caractérisent par une réduction de la formation des ostéophytes (De Hooge et al., 2005). Dans une autre expérience, une faible production de TGF- β et de BMP-2 a été détectée chez ces souris, ce qui pourrait expliquer la faible quantité d'ostéophytes formés au cours de développement de cette maladie. En plus, l'injection intra-articulaire de l'IL-6 chez ces souris est capable de réduire la dégradation du protéoglycane et favoriser l'apparition des ostéophytes (Van de Loo et al., 1997).

L'IL-6 semble avoir deux rôles dans l'OA. Dans les phases précoces, elle est impliquée dans la protection du cartilage en stimulant la production des TIMPs alors que dans les phases plus sévères, elle favorise la formation des ostéophytes en accentuant la production d'une variété de médiateurs, notamment la BMP-2 (Blaney Davidson et al., 2006; Van de Loo et al., 1997).

Pour les autres cytokines, des études ont montré que l'IL-17 et l'IL-18 sont capables de stimuler la production de d'autres cytokines et composants comme l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-8 ainsi que le NO, la PGE2 et le VEGF (Honorati et al., 2002; Futani et al., 2002; Olee et al., 1999; Attur et al., 1997). L'augmentation de l'expression du VEGF favorise la formation des vaisseaux sanguins qui envahissent les tissus articulaires (Honorati et al., 2007; Cho et al., 2006). L'IL-17 et l'IL-18 sont capables aussi d'inhiber la synthèse des constituants du cartilage en stimulant la production des MMPs (Inoue et al., 2008; Dai et al., 2005; Benderdour et al., 2002; Koshy et al., 2002). L'augmentation de l'expression de ces deux cytokines corrèle avec la sévérité des lésions articulaires observées au cours de cette maladie (Chen et al., 2014; Kapoor et al., 2011).

En général, des études ont montré que le traitement des chondrocytes par des cytokines anti-inflammatoires est associé à une diminution de la production de l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 ainsi qu'une augmentation de la synthèse des constituants du cartilage et les TIMPs. Parmi ces cytokines anti-inflammatoires, IL-4, IL-10 et IL-13 restent les plus actives durant cette maladie. Cependant, le niveau de production de ces cytokines semble faible dans les tissus articulaires et donc celles-ci n'arrivent pas à contrarier les effets des médiateurs arthrosiques (Wojdasiewicz et al., 2014; Schuerwegh et al., 2003; Iannone et al., 2001; Martel-Pelletier et al., 1999; Alaaeddine et al., 1999). Le tableau 3 résume le rôle des principales cytokines impliquées dans cette maladie.

Tableau 3: Tableau récapitulatif des principales cytokines impliquées dans la maladie d'arthrose (Adapté de (Wojdasiewicz et al., 2014; Kapoor et al., 2011; Martel-Pelletier et al., 1999).

Cytokines	Activités dans l'arthrose
Pro-inflammatoires:	
IL-1 β et TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> - Hyperrégulées dans les tissus articulaires - Inhibent la synthèse des constituants de la MEC (le collagène, l'aggrécane et Les protéines de liaison) et stimulent celle des MMPs (MMP-1, -3 et -13) - Induits la production des cytokines : IL-6, IL-8 et autres
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> - Expression élevée dans le liquide synoviale OA - Inhibe la production des protéoglycanes - Accentue les effets cataboliques de l'IL-1β - Stimule la production des aggrecanases - Amplifie la synthèse des MMPs induite par l'IL-1β - Induit la production des TIMPs
IL-8	<ul style="list-style-type: none"> - Hyperrégulée dans les tissus articulaires - induit l'expression de: cPLA2, iNOS, IL-6 et MMPs - Amplifie la production de PGE2 et Cox2 induite par TNF-α
IL-15	<ul style="list-style-type: none"> - OA précoce : Expression élevée dans le liquide synoviale - L'expression d'IL-15 corrèle avec celle d'IL-6, MMP-1 et MMP-3
IL-17, IL-18	<ul style="list-style-type: none"> - Hyperrégulées dans les tissus articulaires - Stimulent la production des cytokines: IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 - Stimulent la production de différents médiateurs comme NO, PGE2 et VEGF - Inhibent la synthèse des constituants du cartilage - Stimulent la production des MMPs
Anti-inflammatoires: IL-4, IL-10, IL-13	<ul style="list-style-type: none"> - Hyperrégulées dans les tissus articulaires - Diminuent la production de l'IL-1β, TNF-α, l'IL-6 et des MMPs - Induits la production des TIMPs et l'IL-1Ra

I.C.2.3.2 Oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) est formé à partir de L-arginine sous l'action d'un groupe d'enzyme nommé oxyde nitrique synthase (NOS) (Fermor et al., 2007; Kwon et al., 1990; Palmer et al., 1988). Ce groupe existe sous trois isoformes: NOS neuronale (NOS1), NOS endothéliale (NOS3) et NOS inductible (iNOS) (Fermor et al., 2007). Cette dernière semble avoir un rôle important dans la production du NO dans le cartilage articulaire (Sakurai et al., 1995). Plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont responsables de la stimulation de l'expression de cette enzyme, d'où la forte production du NO dans les conditions arthrosiques (Stadler et al., 1991).

Les effets de NO dans les tissus articulaires sont variés. Ce médiateur est responsable de l'inhibition de la synthèse des constituants du cartilage, la synthèse des MMPs et l'apoptose des chondrocytes (Sasaki et al., 1998; Blanco et al., 1995; Taskiran et al., 1994). Ces effets sont réduits en présence d'un inhibiteur d'iNOS, enzyme responsable de sa production (Abramson et al., 2008; Vuolteenaho et al., 2007). Aussi, des expériences *in vivo* réalisées sur un modèle canin d'OA expérimentale, ont montré que l'inhibition d'iNOS réduit la progression des changements structurants observés au cours de cette maladie. La diminution des lésions cartilagineuses est en corrélation avec la réduction de la synthèse des MMPs, de l'IL-1 β et la PGE2 (Pelletier et al., 1998). Dans une autre étude avec le même modèle animal, il s'est avéré que le NO est impliqué dans l'augmentation de la production de l'enzyme de conversion de l'IL-1 β (ICE) via la suppression de sa protéase inhibitrice 9 (PI-9). L'ICE est une protéase à l'origine de la maturation de l'IL-1 β et l'IL-18, deux cytokines impliquées dans cette maladie (Boileau et al., 2002). De même, le NO est capable d'augmenter les activités de l'IL-1 β par la diminution de l'expression de son antagoniste naturel (IL-1Ra), ce qui accentue les événements cataboliques observés dans le cartilage arthrosique (Pelletier et al., 1996).

I.C.2.4 Eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques impliqués dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. Il existe trois types de ces médiateurs: les prostanoides, les leucotriènes et les hydroxyacides. Généralement, ils sont synthétisés à partir d'un acide gras polyinsaturé à 20 atomes de carbone comme l'acide arachidonique (AA). Celui-ci est libéré sous l'action des phospholipases A2 (PLA2) par hydrolyse des phospholipides membranaires (Figure 10), (Sala et al., 2010; Panigrahy et al., 2010).

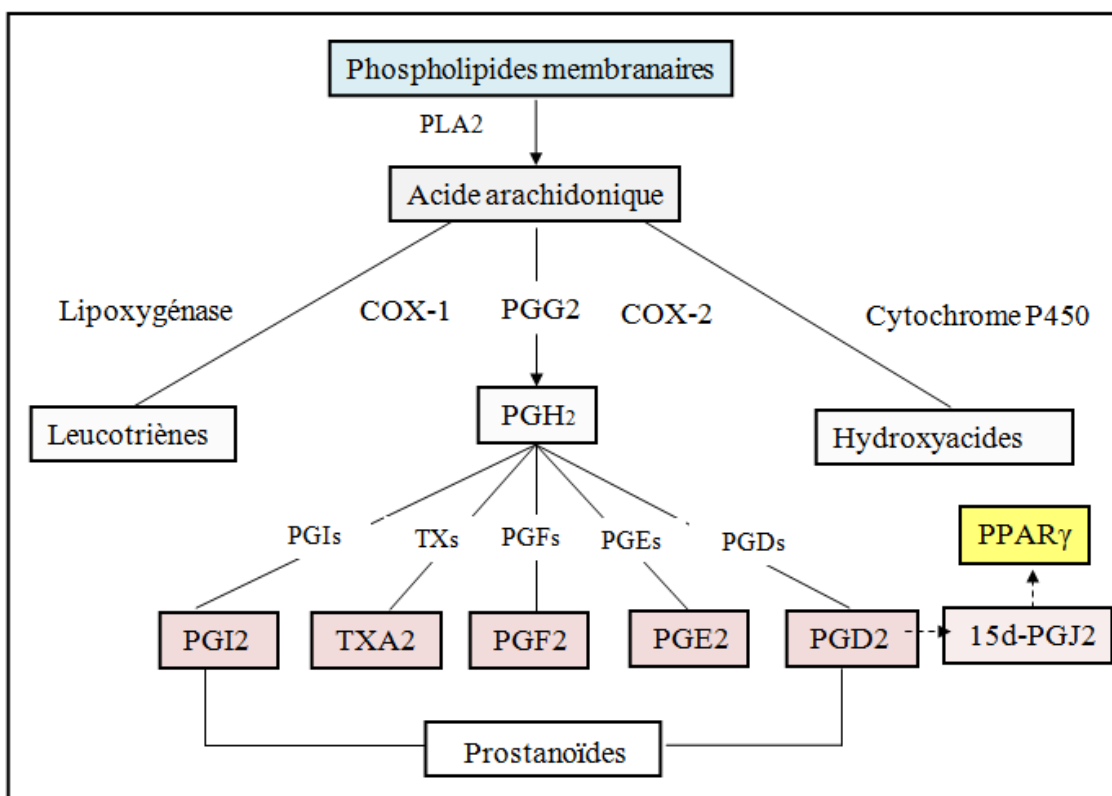


Figure 10: Biosynthèse des eicosanoïdes (Adapté de (Panigrahy et al., 2010; Jouzeau et al., 2004)).

I.C.2.4.1 Phospholipase A2 (PLA2)

Les PLA2 appartiennent à une superfamille d'enzymes jouant un rôle important dans plusieurs activités biologiques (Burke et dennis, 2009). Le groupe IV de la PLA2, plus spécifiquement, la PLA2 cytosolique alpha (PLA2c) semble la plus impliquée dans la

libération de l'AA pour la formation des eicosanoïdes en raison de sa forte affinité au site de clivage situé en position sn-2 de son substrat (Ghosh et al., 2006). En plus de l'AA, d'autres composés biologiquement actifs sont aussi libérés engendrant des changements au niveau de la structure membranaire (Brown et al., 2003). L'utilisation des souris déficientes en PLA2c alpha a montré une réduction de la synthèse de ces eicosanoïdes qui corrèle avec la diminution de la production de l'AA. Cela confirme le rôle majeur de cette enzyme dans la biosynthèse de ces médiateurs lipidiques (Uozumi et al., 1997). La production de la PLA2c est régulée à la hausse par plusieurs médiateurs inflammatoires. En effet, Leistad et al., ont montré que le niveau d'expression de cette enzyme est élevée dans le cartilage arthrosique comparativement au normal, mais cette expression reste plus faible par rapport au cartilage des patients avec AR (Leistad et al., 2004). Plusieurs cytokines pro-inflammatoires ont été impliquées dans la production de cette enzyme, par exemple l'IL-1 β , le TNF α , l'IL-6 et l'IL-8. Les deux premières cytokines sont les plus puissants inducteurs (Leistad et al., 2011). En plus, des études ont affirmé que l'inhibition de cette enzyme dans un modèle animal d'arthrite induite réduit l'inflammation, l'expression de la MMP-3,-8,-9 et -13, et par conséquent la sévérité de l'arthrite (Tai et al., 2010; Raichel et al., 2008).

Donc, selon la voie empruntée, cyclo-oxygénases, lipoxygénases ou bien cytochrome P450, l'AA obtenue sous l'action de la PLA2c est transformé en plusieurs produits différents (sala et al., 2010; Panigrahy et al., 2010). Je m'intéresse dans la partie qui suit à la voie des cyclo-oxygénases. Celle-ci reste la plus étudiée dans le développement de l'OA.

I.C.2.4.2 Cyclo-oxygénases

Les cyclo-oxygénases (COX) possèdent deux activités importantes dans le métabolisme de l'AA. Une activité cyclo-oxygénase responsable de la transformation de l'AA en PGG2 par l'ajout de deux molécules d'oxygène et une activité peroxydase impliquée dans la réduction de la PGG2 en un produit instable la PGH2. Il existe au moins deux isoformes de même poids moléculaire: COX-1 et COX-2 (Dubois et al., 1998). Récemment une nouvelle COX a été découverte, la COX-3. Celle-ci semble être une variante de la COX-1 (Schwab et al., 2003). Le rôle de cette enzyme dans l'OA n'est pas encore établi. Néanmoins, il semble qu'au niveau de système nerveux canin l'activité de la COX-3 est bloquée par des

médicaments analgésiques comme l'acétaminophène (Chandrasekharan et al., 2002). La COX-1 et la COX-2 sont deux enzymes exprimées différemment en fonction des tissus. Dans le cartilage, la COX-1 est une enzyme physiologique exprimée de manière constitutive alors que la COX-2 est inductible et absente dans le cartilage normal (Gosset et al., 2006). Cependant dans d'autres tissus normaux comme le cerveau, les reins des rongeurs et les chondrocytes du cartilage de lapin, la COX-2 est aussi exprimée de manière constitutive (Hétu et Riendeau, 2005; Giordano et al., 2002). Dans le cartilage arthrosique humain, la COX-2 est une cible de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α et autres. Son induction est à l'origine de la surproduction des métabolites lipidiques impliqués dans la progression de l'OA. Contrairement à la COX-1, des éléments de réponses spécifiques (NF- κ B, AP-1, CRE...) localisés dans la région promotrice de la COX-2 sont à l'origine de son induction par des hormones, des facteurs de croissances, des cytokines et autres, ce qui explique son implication dans plusieurs pathologies (Tanabe et Tohnai, 2002; Smith et al., 1996). La différence de la taille du site enzymatique de deux enzymes qui est légèrement plus large pour la COX-2, a favorisé le développement des inhibiteurs sélectifs de cette enzyme (Jouzeau et al., 2004).

I.C.2.4.3 Prostanoïdes

Le produit des COX, PGH₂, constitue une cible pour différentes prostaglandines synthases spécifiques. On retrouve la PGE₂, la PGD₂, la PGF₂, la PGI₂ et le TXA synthases qui sont responsables de la synthèse des prostaglandines, notamment la PGE₂, la PGD₂ et la PGF₂ ainsi que la prostacycline I₂ (PGI₂) et le thromboxane A₂ (TXA₂), respectivement. Les effets de ces métabolites sont médiés par différents récepteurs prostanoïdes (Bos et al., 2004). La PGE₂ et la PGD₂ sont deux prostaglandines montrant des effets opposés dans plusieurs pathologies. Elles feront l'objectif des deux paragraphes ci-dessous. Ensuite, une brève description sera faite pour les autres prostanoïdes.

I.C.2.4.3.1 Prostaglandine E 2 (PGE₂)

La prostaglandine E 2 (PGE₂) est synthétisée sous l'action de la PGE synthase (PGES). Il existe trois isoformes de cette enzyme: cPGES (PGES cytosolique), mPGES-1 (PGES

membranaire) et mPGES-2. Contrairement à la mPGES-2, la cPGES et la mPGES-1 requièrent le glutathion comme cofacteur pour être activées. La mPGES-2 est exprimée de manière constitutive dans plusieurs tissus comme le cœur et le cerveau alors qu'elle est absente dans les vésicules séminales. Son activité est couplée aussi bien à celle de la COX-1 qu'à celle de la COX-2. Comme la mPGES-2, la cPGES est exprimée de manière constitutive dans plusieurs tissus. L'expression de cette enzyme n'est pas modifiée par des stimuli pro-inflammatoires (Helliwell et al., 2004; Tanikawa et al., 2002). L'activité fonctionnelle de la cPGES est liée à celle de la COX-1 alors que celle de la mPGES-1 est associée principalement à la COX-2. En effet, la cPGES est capable de transformer seulement la PGH2 issue de l'action de la COX-1, et non pas de la COX-2. La différence d'affinité pour le produit de ces deux COX a été expliquée dans un premiers temps par la localisation différente des deux COX. La COX-1 dans le réticulum endoplasmique alors que la COX-2 dans l'enveloppe nucléaire (Ricciotti et FitzGerald, 2011). Cependant, des études ont montré que la COX-1 et la COX-2 sont réparties uniformément dans les deux structures. La raison pour laquelle il y a cette préférence pour l'une ou l'autre COX n'est pas encore bien établie (Spencer et al., 1998).

Contrairement à la mPGES-2 et la cPGES, la mPGES-1 est inductible. Plusieurs facteurs ont été impliqués dans l'augmentation de l'expression de cette enzyme. L'analyse de la région promotrice du gène de la mPGES a permis d'identifier des sites de fixation des facteurs de transcription: C/EBPs, AP-1, Egr-1 et autres. Ces derniers sont une cible des voies de signalisation induites par des facteurs pro-inflammatoires comme le LPS, l'IL-1 β et le TNF- α (Naraba et al., 2002). Comme la COX-2 et la mPGES sont deux enzymes inductibles dans des conditions inflammatoires, les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de la mPGES pourraient être communes avec celles de la COX-2, ce qui expliquerait peut-être le couplage de l'activité COX-2/mPGES-1.

La PGE2 produite sous l'action de ces isomérases joue un rôle important dans plusieurs processus physiologiques et pathologies dépendamment du récepteur impliqué. Il existe quatre types de récepteur de la PGE2 appartenant à la famille des rhodopsines: EP1-EP4. Généralement, les récepteurs de la PGE2 sont couplés à trois types de protéines G: Gq (EP1),

Gs (EP2/4) et Gi (EP3). La fixation de la PGE2 sur le récepteur EP1 conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC) responsable de la transformation du PIP2 (Phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate) en IP3 (Inositol 2,4,5 triphosphate) et la libération du DAG (diacyl glycérol). L'IP3 va provoquer la libération du calcium dans le cytoplasme qui sera à l'origine de l'activation de plusieurs enzymes comme la cPLA2. Aussi, il va permettre l'activation de la protéine kinase C (PKC) conjointement avec le DAG. L'activation de la PKC permet l'induction de la voie MAP Kinases qui provoque l'expression de plusieurs gènes inflammatoires comme celui de la cPLA2, la Cox-2 et la mPGES-1. La fixation de la PGE2 sur EP2/EP3 conduit à l'activation de l'adénylate cyclase qui catalyse la formation de l'AMPc. Ce dernier entraîne à son tour l'activation de la protéine kinase A (PKA) modulant l'activité de plusieurs substrats. Pour le récepteur EP3, l'activation de la Gi après la liaison de PGE2 provoque l'inhibition de l'adénylate cyclase et donc la production de l'AMPc (Bos et al., 2004). Néanmoins, une étude publiée par Burkey et Regan a montré que la stimulation du récepteur EP3 entraîne l'activation des MAP Kinases (Burkey et Regan, 1995). Ceci pourrait être expliqué par l'inactivation de la PKA en absence de l'AMPc. En effet, VanRenterghem et al., ont démontré que la PKA pourrait réguler négativement l'activité des MAP kinases (VanRenterghem et al., 1994).

La PGE2 joue un rôle important dans la pathologie de l'OA. Elle est synthétisée par les cellules des tissus articulaires comme les chondrocytes, les synoviocytes et autres. Cette prostaglandine reste la plus abondante dans l'articulation des personnes malades (Fahmi, 2004). Son niveau de production est régulé à la hausse dans les tissus articulaires arthrosiques par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et TNF α (LeGrand, 2001). La PGE2 est impliquée dans l'activation de plusieurs processus cataboliques et anaboliques. Le traitement des explants du cartilage arthrosique par la PGE2 exogène inhibe la synthèse des protéoglycanes de manière dose dépendante. De même, la PGE2 est responsable de la dégradation des constituants du cartilage en favorisant la production des MMPs et les ADAMTS, plus spécifiquement, MMP-13 et ADAMTS-5. Parmi les quatre récepteur de la PGE2, le EP4 semble le plus exprimé dans le cartilage arthrosique. Le blocage de ce récepteur par un inhibiteur spécifique semble réduire la survenue de ces événements (Attur et al., 2008). Aussi, d'autres études ont montré que cette prostaglandine participe à la

progression de cette maladie par l'induction de l'apoptose des chondrocytes, la production des facteurs angiogéniques ainsi que d'autres médiateurs inflammatoires (Miwa et al., 2000; Harada et al., 1994). Dans une autre étude, des effets contradictoires ont été évoqués. Otsuka et al., ont affirmé que la PGE2 via son récepteur EP2 favorise la prolifération des chondrocytes, la régénération du cartilage articulaire ainsi que la diminution de l'inflammation (Otsuka et al., 2009). Au niveau du tissu osseux, la PGE2 favorise la résorption osseuse par les ostéoclastes suggérant que cette prostaglandine stimule la différenciation des précurseurs ostéoclastiques (Lader et Flanagan, 1998 ; Robinson et al., 1975). En effet, Sanuki et al., ont trouvé que la PGE2 augmente l'expression du ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANKL) par les ostéoblastes et diminue celle de son récepteur soluble ostéoprotégérine (OPG). L'interaction du RANKL et le récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANK) exprimé par les précurseurs ostéoclastiques favorise la maturation des ostéoclastes et par conséquent la résorption osseuse (Sanuki et al., 2010).

I.C.2.4.3.2 Prostaglandine D 2 (PGD2)

La prostaglandine D2 (PGD2) est synthétisée à partir de la PGH2 sous l'action de deux types d'enzymes: la prostaglandine D synthase hématopoïétique (H-PGDS) et la prostaglandine D synthase de type lipocaline (L-PGDS) (Helliwell et al., 2004). La H-PGDS est une protéine cytosolique de 26 kDa. Elle appartient à la classe Sigma glutathion S-transférase (Kanaoka et Urade, 2003). La présence des ions divalents comme le Ca^{2+} ou le Mg^{2+} augmente l'activité de cette enzyme (Inoue et al., 2003). La H-PGDS fut isolée par Kanaoka et al., à partir de la rate du rat (Kanaoka et al., 1997). Elle est présente aussi dans le thymus, la peau, le foie et autres tissus. On la retrouve exprimée essentiellement par les cellules immunitaires et inflammatoires telles que les mastocytes, les cellules présentatrices d'antigènes (histiocytes, dendritique, Kupffer) et les cellules Th2 (Kanaoka et Urade, 2003; Urade et al., 1989). La H-PGDS est largement différente de la L-PGDS par sa distribution tissulaire, ses propriétés catalytiques, sa séquence d'acide aminé, sa localisation chromosomique, sa structure trois dimensionnelle (3D) ainsi que celle du gène (Urade et Hayaishi, 2000). La L-PGDS est une glycoprotéine hautement glycolysée d'un poids

moléculaire qui se situe aux alentours de 26 KDa, dépendamment du degré de glycosylation. Elle fut isolée la première fois par Clausen et al., à partir du liquide cébrospinal (Clausen, 1961). La L-PGDs appartient à la superfamille des lipocalines qui se caractérisent par la fixation des ligands hydrophobes comme le rétinol et l'acide rétinoïque. Elle est exprimée par les cellules du cerveau, du cœur, de la rétine, du cartilage ainsi que ceux de l'os. La L-PGDS est produite dans plusieurs fluides corporels comme le liquide amniotique, séminal, l'humeur aqueuse et le plasma (Urade et Hayaishi, 2000; Gachon, 1994). La concentration de cette glycoprotéine dans ces liquides biologiques sert comme indicateur dans le diagnostic de plusieurs perturbations physiologiques, notamment au niveau du système nerveux, cardiovasculaire et rénal (Urade et Hayaishi, 2000). L'étude de la structure 3D de ces enzymes plus spécifiquement celle d'H-PGDS pourrait contribuer au développement des médicaments contre l'allergie et l'inflammation (Inoue et al., 2003).

La PGD2 exerce ses effets principalement via deux types de récepteurs couplés à la protéine G: le récepteur D prostanoloïde (DP1) et le récepteur chimiotactique exprimée sur Th2 (CRTH2). L'induction de DP1 par la PGD2 conduit à l'augmentation de l'AMPc intracellulaire et par conséquent l'activation de la PKA alors que celle de la CRTH2 favorise la libération du calcium dans le cytoplasme et l'activation de la PKC (Bos et al., 2004). Les deux récepteurs partagent une faible homologie de séquence en acides aminés. Le DP1 présente une plus grande homologie avec d'autres récepteurs prostanoloïdes tels que le TP et EP3, par contre le CRTH2 est plus proche des récepteurs FMLP, C3a et C5a (Hirai et al., 2001; Hirata et al., 1994).

Plusieurs travaux montrent l'implication de DP1 et CRTH2 dans plusieurs pathologies. Cependant, le rôle de ces deux récepteurs dans l'OA n'est pas encore clarifié. Dans un travail publié par notre laboratoire, nous avons démontré que les deux récepteurs sont exprimés par les chondrocytes humains. L'utilisation des agonistes spécifiques pour chaque récepteur a montré l'implication du DP1 dans la diminution de la production de la MMP-1 et la MMP-13. Le traitement des chondrocytes par un inhibiteur de PKA bloque cette diminution suggérant l'implication de la voie DP1/cAMP/PKA dans cet effet (Zayed et al., 2008). En plus des chondrocytes, les cellules de tissus osseux plus spécifiquement les ostéoclastes et les

ostéoblastes, expriment aussi les deux récepteurs. Le traitement des ostéoclastes par la PGD2 diminue l'ostéoclastogenèse et donc inhibe la résorption osseuse. Ceci a été attribué plus particulièrement au récepteur DP1 (Durand et al., 2008). Au niveau des ostéoblastes, l'activation du DP1 diminue la production de l'ostéoprotégérine (OPG) alors que celle de CRTH2 inhibe RANKL. La PGD2 semble avoir des effets différents selon le récepteur induit et le type cellulaire (Gallant et al. 2005).

En plus des tissus articulaires, le rôle de la PGD2 via ses deux récepteurs a été étudié dans d'autres tissus. Au niveau du système nerveux, la PGD2 semble avoir un rôle protecteur en réduisant la toxicité neuronale induite par des concentrations élevées de glutamate. Cet effet a été mimé en utilisant un agoniste spécifique de DP1. Par contre, l'agoniste de CRTH2 a accentué la mort des neurones. L'utilisation des inhibiteurs de PKA bloque l'effet protecteur de la PGD2, ce qui confirme l'implication de DP1 dans cette protection (Liang et al., 2005).

La PGD2 est impliquée aussi dans le développement des maladies allergiques comme l'asthme dépendamment du récepteur activé. Le DP1 est exprimé au niveau des muscles lisses et les plaquettes assurant une dilatation vasculaire et bronchique ainsi qu'un rôle antiagrégant, respectivement. On le retrouve aussi au niveau des cellules épithéliales, fibroblastiques et dendritiques (Walch et al., 1999; Whittle et al., 1983). L'activation de ce récepteur par son agoniste BW245C réduit la prolifération des cellules dendritiques ainsi que la production des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 (Faveeuw et al., 2003). L'expression de ce récepteur au niveau des cellules immunitaires reste plus faible que celle de CRTH2, et donc la signalisation médiée par ce dernier reste prédominante par rapport à celle de DP1 en présence de la PGD2 (Pettipher, et al., 2007). Pettipher a rapporté que l'expression du CRTH2 est importante au niveau des éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes Th2. L'induction de ce récepteur permet l'activation et le recrutement des éosinophiles et les lymphocytes Th2 au niveau de site de l'inflammation (Pettipher, 2008). En plus, la PGD2 favorise la stimulation de la production des cytokines pro-inflammatoires par les cellules humaines Th2 via CRTH2. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un agoniste de ce récepteur, DK-PGD2. Par ailleurs, le traitement des cellules Th2 par l'agoniste de DP1, BW245C n'a pas démontré cet effet (Xue, et al., 2005).

D'après ces données, il semble que l'activation des cellules immunitaires est contrôlée par deux types de récepteurs possédant des effets opposés: DP1 joue un rôle anti-inflammatoire alors que CRTH2 est plus impliqué dans la médiation des effets pro-inflammatoires. Enfin, la PGD2 peut exercer ses effets indépendamment de ses deux récepteurs. Cette prostaglandine est capable de se convertir de façon non enzymatique en 15d-PGJ2. Ce métabolite semble avoir un rôle anti-inflammatoire et anti-catabolique. La 15d-PGJ2 est capable d'inhiber les effets médiés par les cytokines pro-inflammatoires et des MMPs (Fahmi et al., 2001; Boyault et al. 2001). Elle exerce son rôle dépendamment de PPAR γ ou indépendamment de ce récepteur nucléaire en inhibant des médiateurs de la voie de signalisation NF- κ B (Rossi et al., 2000; Straus et al., 2000). Le rôle de PPAR γ dans l'OA sera discuté un peu plus loin.

I.C.2.4.3.3 Autres prostanoides

En plus de la PGE2 et la PGD2 d'autres prostanoides interviennent dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques telles que la PGI2, la PGF2 et le TXA2.

Les cellules endothéliales sont une source majeure de la PGI2 (Kawabe et al., 2010). Cette prostacycline exerce ses effets via son récepteur IP (Ogawa et al., 1995). Elle est impliquée dans l'inhibition de la contraction vasculaire et l'agrégation plaquettaire. À l'état physiologique, la PGI2 participe au maintien de l'homéostasie vasculaire et prévient le développement des thromboses (Bos et al., 2004). En revanche, des études ont montré une production élevée de la PGI2 dans des conditions inflammatoires (Stitham et al., 2011). Les souris déficientes en récepteur IP semblent répondre moins à l'inflammation induite par la carragénine ainsi que la douleur associée (Murata et al., 1997). Aussi, la PGI2 est produite en grande quantité dans le fluide synoviale des personnes arthritiques, et donc elle contribue au développement des événements inflammatoires associés à cette pathologie (Brodie et al., 1980).

La PGF2 est synthétisée à partir de la PGH2 sous l'action de la PGF2 synthase (Helliwell et al., 2004). Elle exerce ses effets via son récepteur FP (Sugimoto et al., 1997). Ce dernier semble le moins sélectif des récepteurs prostanoides à cause de son affinité

significative pour la PGD2 et la PGI2 (Abramovitz et al., 2000). La PGF2 joue un rôle positif dans l'ovulation, la contraction musculaire ainsi que la reproduction (Saito, et al., 2003; Sugimoto, et al., 2000). Elle est souvent utilisée pour la diminution de la pression intraoculaire dans le traitement du glaucome (Alexander et al., 2002). D'autres études ont signalé l'implication de cette prostaglandine dans la perturbation du fonctionnement rénal, cardiaque et nerveux (Ricciotti et FitzGerald, 2011). L'augmentation de la production de la PGF a été détectée dans plusieurs pathologies telles que l'AR et l'OA (Basu, et al., 2001).

Enfin, le TXA2 est un métabolite instable généré sous l'action de la TX synthase. Il est connu par son rôle vasoconstricteur. Le TXA2 est produit principalement par les plaquettes sanguines assurant l'adhésion et l'agrégation de celles-ci (Ricciotti et FitzGerald, 2011; Nakahata, 2008). Le rôle de ce métabolite dans l'OA n'est pas encore bien établi.

I.C.2.5 Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs)

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils participent dans une variété de processus physiologiques et pathologiques. Ils sont représentés sous trois formes variantes: PPAR alpha (α), PPAR bêta (β) et PPAR gamma (γ) (Desvergne et Wahli, 1999). Ces trois isoformes sont codés par des gènes différents. Chez l'humain, ils sont localisés au niveau des chromosomes 22, 6 et 3, respectivement (Yoshikawa et al., 1996; Greene et al., 1995; Sher et al., 1993).

I.C.2.5.1 Structure des PPARs

La région traduite des gènes PPARs est composée de six exons codant pour quatre domaines structurants communs: le premier exon code la région régulatrice A/B (domaine N terminal), les exons 2 et 3 représentent le domaine de fixation à l'ADN (DBD ou domaine C), l'exon 4 code pour la région charnière et les deux derniers exons codent pour la région de liaison au ligand (LBD ou domaine E/F) (Desvergne et Wahli, 1999). Contrairement aux PPAR α et PPAR β , PPAR γ contient trois exons de plus. L'épissage alternatif du gène PPAR γ pourrait être à l'origine de la production de quatre transcrits distincts: PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3 et PPAR γ 4 (Sundvold et Lien, 2001; Fajas et al., 1997; Fajas et al., 1998). Dans les

cellules normales seulement deux protéines sont exprimées. Les transcrit PPAR γ 1, PPAR γ 3 et PPAR γ 4 génèrent une protéine composée de 477 acides aminés généralement nommée PPAR γ 1, alors que le transcrit PPAR γ 2 code pour une protéine de 505 acides aminés portant son nom (Figure 11), (Wang et al., 2006; Desvergne et Wahli, 1999).

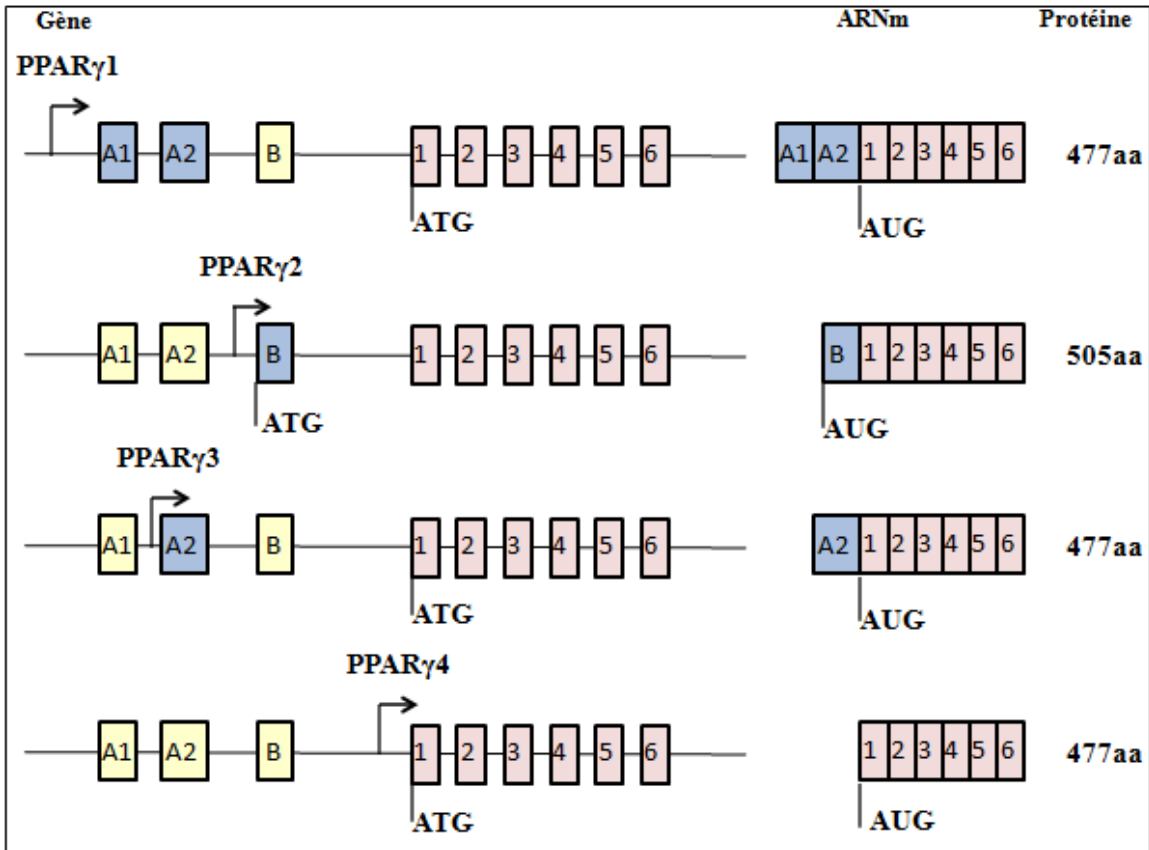


Figure 11: Les différents isoformes de PPAR γ . Les isoformes de PPAR γ possèdent six exons en communs. L'exon A1, A2 et B sont à l'origine de quatre transcrits distincts. L'ARNm PPAR γ 1 contient 8 exons dont A1 et A2 sont non codants. Celui de PPAR γ 2 comprend sept exons et son site d'initiation de la transcription se situe en amont de l'exon B. Contrairement aux autres transcrits, la traduction de l'ARNm PPAR γ 2 conduit à la synthèse d'une protéine différente de 505aa. L'ARNm PPAR γ 3 est codé par sept exons dont A2 est non codant. Enfin, l'ARNm PPAR γ 4 comprend six exons, son site d'initiation de transcription est localisé en amont de l'exon 1 (Adapté de (Wang et al., 2006; Sundvold et Lien, 2001; Desvergne et Wahli, 1999)).

I.C.2.5.2 Distribution tissulaire des PPARs

Le profil d'expression de ces récepteurs varie en fonction du type tissulaire. PPAR α est exprimé dans les tissus qui contiennent un important métabolisme mitochondrial et peroxyosomal des acides gras. Il est présent au niveau du foie, des reins, les tissus adipeux, l'intestin, le cœur et les muscles squelettiques. Il est impliqué dans le métabolisme lipidique, et joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre énergétique (Yoon, 2009; Braissant et al., 1996). Aussi, il réduit l'inflammation, la progression de l'athérosclérose et les risques cardiovasculaires (Zandbergen et Plutzky, 2007). PPAR β est exprimé de façon constitutive dans la majorité des tissus et son expression est plus élevée que celle des autres PPARs sauf dans les tissus adipeux (Vanden Heuvel, 1999). Il joue un rôle dans le métabolisme lipidique, le développement embryonnaire et la prolifération des cellules épidermiques (Peters et al., 2000). Concernant l'expression de PPAR γ , elle est majoritaire dans les tissus adipeux, et est à moindre degré dans les autres tissus tels que le foie, la rate, les testicules, les muscles squelettique et le cerveau (Vanden Heuvel, 1999; Elbrecht et al., 1996). Il assure la différenciation des adipocytes, le stockage des acides gras et le métabolisme de glucose (Martin, 2009). On le retrouve aussi présent dans les cellules immunitaires, les ostéoblastes, les ostéoclastes, les chondrocytes et les synoviocytes (Figure 12), (Martin, 2009; Afif et al., 2007; Ji et al., 2001).

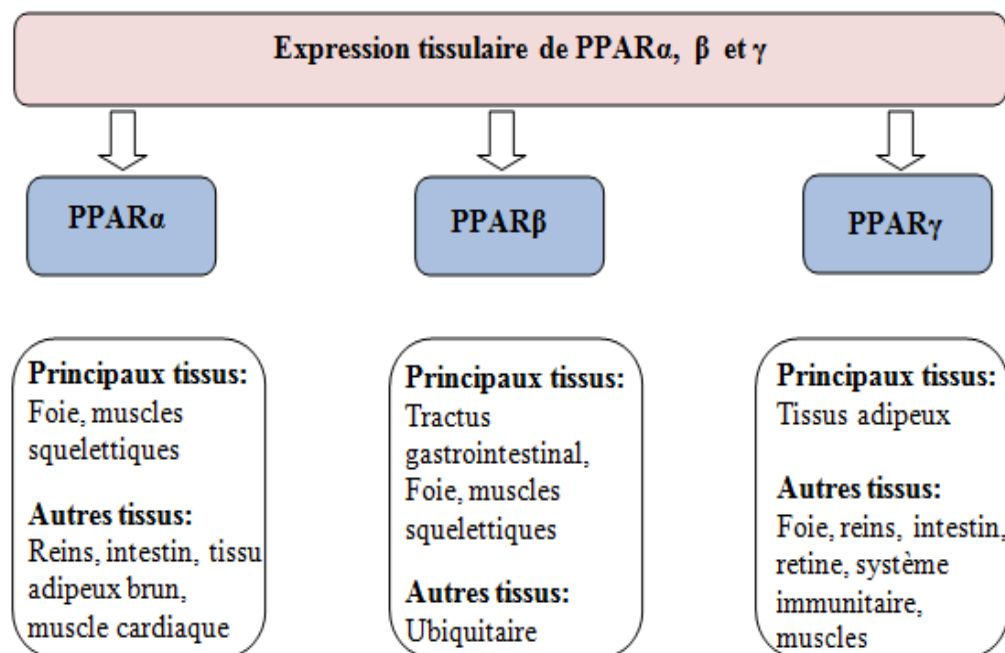


Figure 12: Expression tissulaire de PPAR α , β et γ (Adapté de (Grygiel-Górniak, 2014)).

I.C.2.5.3 Ligands des PPARs

Les PPARs sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. Ils présentent une cible thérapeutique importante à cause de leurs interactions spécifiques avec plusieurs ligands. Les acides gras insaturés sont des ligands naturels communs pour les trois isoformes de PPARs. Comparativement à ceux-ci, les acides gras saturés ont une affinité plus faible aux PPARs. Toutefois, d'autres ligands sont capables de lier de façon spécifique un seul isotype de PPARs. À cause de l'implication de ces récepteurs dans une variété de processus biologiques, des ligands synthétiques ont été développés afin de corriger plusieurs troubles métaboliques (Tableau 4), (Weiss et al., 2011; Barrera et al., 2008).

Le PPAR α est capable de lier plusieurs acides gras insaturés tels que l'acide palmitoléique, oléique, linoléique, arachidonique, et des eicosanoïdes comme l'acide 8-(S)-hydroxyeicosatetraénoïque (8-(S)-(HETE)) et le leucotriène B4 (LTB4) deux médiateurs de l'inflammation. D'autres ligands beaucoup moins sélectifs peuvent interagir avec PPAR α tels que les lipoprotéines oxydés ainsi que les produits issus de l'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase (Bishop-Bailey et Wray, 2003; Desvergne et Wahli, 1999). En plus des

ligands endogènes, PPAR α peut aussi être activé par des ligands synthétiques. Les molécules de la famille des fibrates ont été identifiées comme des ligands synthétiques de PPAR α , plus spécifiquement le clofibrate et le fénofibrate sont des ligands sélectifs pour ce récepteur. Généralement, ces drogues sont capables de réguler le taux des triglycérides dans le sang et sont utilisées souvent pour leur effet hypolipidémiant (Yoon, 2009; Willson et al., 2000).

Le PPAR β se lie aux acides gras insaturés et saturés. Contrairement à différents eicosanoïdes, l'acide dihomog- γ -linoléique, linoléique, arachidonique et palmitique présentent une bonne affinité au PPAR β à des faibles concentrations (Berger et Moller, 2002; Xu et al., 1999). Des études *in vitro* ont montré que les agonistes synthétiques du récepteur de la PGI₂, iloprost et carbacycline pourraient être utilisés comme des ligands synthétique de PPAR β (Desvergne et Wahli, 1999; forman et al., 1997). L'isoprost est souvent utilisé pour le traitement de l'hypertension pulmonaire. Cependant, aucune étude clinique à vérifier l'efficacité de ces drogues autant que ligands de PPAR β (Huang, 2008).

Les principaux ligands de PPAR γ sont l'acide oléique, linoléique et arachidonique (Xu et al., 1999). Plus spécifiquement, se sont les produits du métabolisme de ces composés qui représentent une forte efficacité de liaison à ce récepteur, par exemple l'acide hydroxyoctadécanoïque (9-HODE et 13-HODE), la delta-12-prostaglandine J₂ (δ 12-PGJ₂) et la 15-déoxy-D-12,14-prostaglandine J₂ (15d-PGJ₂). La 15d-PGJ₂ se fixe au PPAR γ à des concentrations micromolaires. Elle reste le ligand endogène le plus utilisé lors des études *in vitro* à cause de son efficacité et de sa forte affinité de liaison à ce récepteur (Willson et al., 2000).

Les ligands synthétiques de PPAR γ sont représentés par les molécules antidiabétiques comme les glitazones. On retrouve dans ce groupe de médicaments, le troglitazone, le rozigliatzone et le pioglitazone (Willson et al., 2000; Lehmann et al., 1995). Ces derniers sont prescrits avec précautions surtout chez les patients susceptibles de développer des maladies hépatiques et cardiaques. Le troglitazone a été retiré du marché des médicaments à cause de ses effets indésirables très répandus (Erdmann et al., 2009; Toyota et Ueno, 2000). Celui-ci, n'a jamais été commercialisé au Canada. Autres molécules synthétiques, les médicaments de

la catégorie des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'indométacine et l'ibuprofène sont aussi considérés comme des ligands de ce récepteur (Lehmann et al., 1997).

Tableau 4: Les différents ligands naturels et synthétiques des PPARs (Adapté de (Grygiel-Górniak, 2014; Yoon, 2009; Desvergne et Wahli, 1999)).

Principaux ligands naturels et synthétiques de PPARα, β et γ		
PPARα	PPARβ	PPARγ
Ligands naturels -Acides gras -Leucotriène B4 - 8-HETE Ligands synthétiques Agents hypolipémiants: -Fénofibrate -Clofibrate -Gemfibrozil	Ligands naturels -Acides gras Ligands synthétiques Analogues de la PGI2: -Carbacycline -Iloprost	Ligands naturels -Acides gras -9- et 13-HODE -15d-PGJ2 Ligands synthétiques -Farglitazar -S26948 -INT131 Agents hypoglycémiants: -Rosiglitazone -Pioglitazone -Troglitazone -Ciglitazone Anti-inflammatoires non stéroïdiens : -Indométacine -Ibuprofène

I.C.2.5.4 Mode d'action des PPARs

En absence de ligands, les PPARs se retrouvent associés à des corépresseurs empêchant la liaison de ces récepteurs à l'ADN. La présence de ligand modifie la conformation structurelle des PPARs, ce qui influence leur affinité de liaison avec les corépresseurs. La présence des facteurs d'échange favorise le remplacement de ces corépresseurs par des facteurs coactivateurs renforçant la transactivation du gène cible (Glass et al., 1997; Horwitz et al., 1996).

Après activation des PPARs par des ligands naturels ou synthétiques, ils sont capables de moduler l'expression de nombreux gènes, plus spécifiquement ceux qui possèdent au niveau de la région promotrice une séquence de réponse spécifique au PPARs nommée PPRE. La liaison des PPARs au niveau de cette région nécessite en premier l'interaction du complexe ligand/PPAR avec le récepteur X de rétinoïdes (RXR) (Kliwer et al., 1992). La PPRE et le RXR jouent un rôle important dans la spécificité de liaison des trois isoformes de PPARs. La région PPRE ciblée par le complexe ligand/PPARs /RXR est constituée de deux séquences répétitives séparées par un seul nucléotide, DR1 (Tugwood et al., 1992). Les PPARs interagissent essentiellement avec la séquence située dans la région 5' du DR1 tandis que RXR occupe la région 3' (Ijpenberg et al., 1997). Selon Desvergne et Wahli, PPAR γ se lie fortement à la région PPRE comparativement aux PPAR α et PPAR β . Aussi, il semble que sa fixation est indépendante de l'identité de la région 5'. Par contre, cette dernière est déterminante pour la liaison des autres isoformes de PPARs. La liaison de PPARs au niveau de l'ADN est aussi sous le contrôle des isotypes du récepteur RXR. En effet, l'isotype RXR γ semble renforcer la liaison du complexe ligand/PPARs à l'ADN en comparaison avec RXR α (Figure 13), (Desvergne et Wahli, 1999; Juge-Aubry et al., 1997).

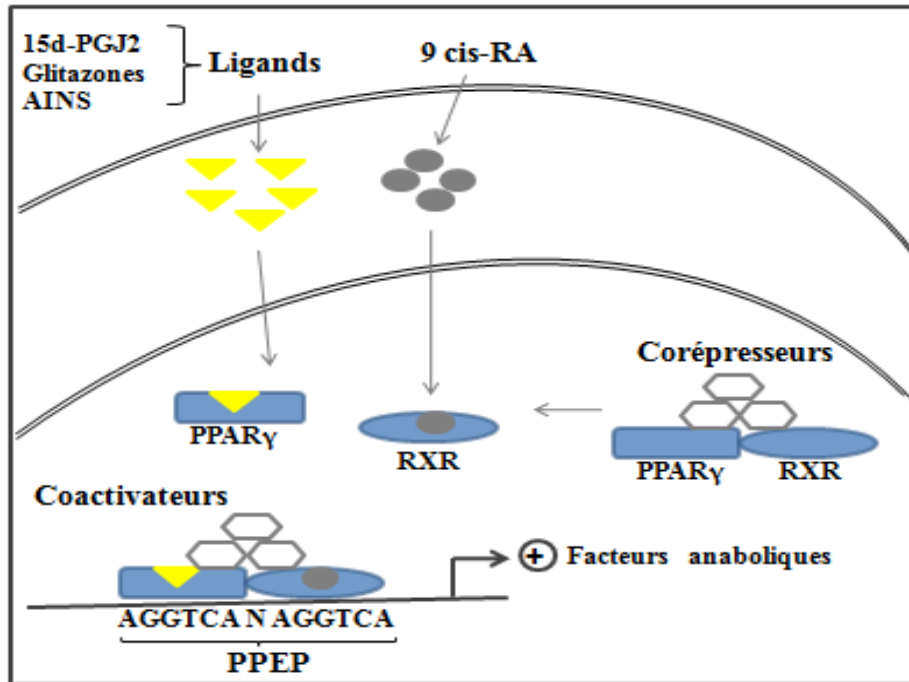


Figure 13: Mécanisme d'action de PPAR γ . La transcription des gènes cibles se fait après liaison de PPAR γ avec son ligand. La fixation du complexe ligand/PPAR γ au niveau du promoteur de gène est réalisée après interaction avec un autre récepteur nommé RXR qui lie son propre ligand. La liaison du complexe ligand-PPAR γ /RXR-ligand s'effectue au niveau d'une séquence de réponse spécifique nommée, PPEP. La transcription du gène est facilitée suite à l'échange des corépresseurs par des coactivateurs (Adapté de (Wei et al., 2012)).

I.C.2.5.5 Activité transcriptionnelle des PPARs

La capacité de PPARs d'initier ou de supprimer la transcription d'un gène dépend de la présence des cofacteurs régulateurs. Il existe deux types de ces cofacteurs: activateurs et répresseurs (Horwitz et al., 1996). Les cofacteurs activateurs facilitent la transcription du gène cible en acétylant les histones proches du promoteur d'intérêt provoquant l'ouverture de la chromatine pour une meilleure fixation du complexe sur la région régulatrice ainsi que les enzymes nécessaires à la transcription. On retrouve dans cette catégorie les cofacteurs CBP/p300, SRCs, PBP, PGC1 et autres (Glass et al., 1997; Spencer et al., 1997). La majorité de ces cofacteurs régulateurs sont ligands-dépendant. Cependant, certains d'autres eux sont capables de fixer les PPARs en absence de ligand provoquant une transcription basale du gène

d'intérêt (Zhu et al., 1997). Concernant les corépresseurs RIP-140, N-CoR-2 et SMRT, ils sont impliqués dans la répression des gènes cibles de PPARs en recrutant des enzymes déacétylases (Pazin et Kadonaga, 1997; Horwitz et al., 1996). L'ensemble de ces cofacteurs régulateurs ne sont pas spécifiques au PPARs. D'autres récepteurs nucléaires peuvent interagir avec ces enzymes réduisant leur disponibilité, ce qui peut modifier l'activité transcriptionnelle des PPARs (Glass et al., 1997; Horwitz et al., 1996).

PPARs sont capables aussi d'inhiber de façon indirecte la transcription d'un gène cible par transrépression. PPARs peuvent lier le facteur de transcription responsable de l'activation d'un gène et/ou son cofacteur activateur réprimant ainsi sa transactivation (Ricote et Glass, 2007). Par ailleurs, des modifications post-traductionnelles de PPARs, notamment la phosphorylation, l'ubiquitination et autres peuvent affecter l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs en modulant leurs interactions pour les ligands, les co-activateurs, les RXR ainsi que les gènes cibles (Ahmadian et al., 2013; Desvergne et Wahli, 1999).

I.C.2.5.5 Rôle de PPAR γ dans l'arthrose

Les PPARs jouent un rôle important dans diverses pathologies. Plusieurs études ont été effectuées afin d'établir le lien entre ces récepteurs et l'OA. Contrairement aux autres isoformes, PPAR γ a suscité un intérêt important à cause de son implication dans les événements cataboliques et inflammatoires liés à cette maladie. L'expression de PPAR γ a été détectée au niveau des chondrocytes, les synoviocytes ainsi que les cellules du tissu osseux (Fahmi et al., 2011).

Des études de notre laboratoire ont montré que PPAR γ joue un rôle anti-inflammatoire dans l'OA. L'activation de PPAR γ réduit l'expression de la COX-2, la mPGES et iNOS induite par l'IL-1 β ainsi que la production des médiateurs inflammatoires tels que la PGE2 et le NO (Li et al., 2005; Fahmi et al., 2002; Fahmi et al., 2001). Aussi, il a été constaté que PPAR γ a un rôle anti-catabolique en contrariant l'effet de l'IL-1 β . En effet, le traitement des chondrocytes humains par l'agoniste de PPAR γ , la 15d-PGJ2 inhibe l'expression des MMPs, notamment la MMP-13 induite par cette cytokine (Fahmi et al., 2001). Comme dans les chondrocytes, l'activation de PPAR γ au niveau des cellules synoviales arthrosiques réduit

l'expression de plusieurs médiateurs inflammatoires et cataboliques tels que l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et la MMP-3 (Yamasaki et al., 2002; Ji et al., 2001). De même d'après des travaux de notre laboratoire, il s'est avéré que l'activation de PPAR γ par la 15d-PGJ2 au niveau des synoviocytes inhibe la production de la MMP-1 induite par l'IL-1 β via l'altération de l'activité de liaison du facteur de transcription AP-1 (Fahmi et al., 2002). Au niveau du tissu osseux, Mbalaviele et al., ont rapporté que l'activation de PPAR γ par la 15d-PGJ2 pourrait être impliquée dans l'inhibition de la résorption osseuse en bloquant la différenciation des ostéoclastes induite par le ligand de l'ostéoprotégérine (OPGL) via l'altération de l'activité de NF- κ B (Mbalaviele et al., 2002).

Des études *in vivo* ont été aussi effectuées afin de confirmer le rôle de ce récepteur nucléaire dans l'OA. Le pioglitazone, un ligand synthétique de PPAR γ administré à différents modèles animaux dont l'OA a été induite montre une réduction des lésions cartilagineuses ainsi que la production des médiateurs cataboliques et inflammatoires. (Boileau et al., 2007; Kobayashi et al., 2005). De même, Vasheghani et al., ont rapporté que les souris déficientes en PPAR γ se caractérisent par une dégradation du cartilage articulaire, une hypocellularité et une inflammation de la membrane synoviale. Aussi, le cartilage articulaire de ces souris montre une expression élevée des médiateurs arthrosiques (Vasheghani et al. 2013).

D'après ces travaux, il semble que PPAR γ joue un rôle anti-inflammatoire et anti-catabolique en inhibant la production des médiateurs impliqués dans l'OA.

I.C.2.6 Gènes à réponse précoce

Plusieurs gènes à réponse précoce ont été étudiés. Ils ont été nommés ainsi à cause de leur réponse immédiate à une stimulation. Les gènes c-fos et c-Jun codant le facteur de transcription AP-1 sont les premiers à être caractérisés (Curran et Franza, 1988). Une autre famille de ce type de gène a été identifiée, notamment les gènes de facteurs de réponse de croissance précoce (Egr). Il existe quatre membres dans cette famille: Egr-1 (connu aussi sous le nom de NGFI-A, krox24, et zif268)), Egr-2, Egr-3 et Egr-4 (O'Donovan et al., 1999). Il a été constaté dans des études l'importance d'Egr-1 dans la régulation de l'expression des gènes

impliqués dans de nombreux événements biologiques. De ce fait, je m'intéresserai dans cette partie plus particulièrement à ce facteur.

I.C.2.6.1 Structure d'Egr-1

Egr-1 est un facteur de transcription à doigts de zinc. Son domaine de liaison à l'ADN contient trois motifs en doigts de zinc. Il se lie à l'ADN sur une séquence nommée EBE (Egr1 binding element). Au niveau structural, on retrouve trois grands domaines: la région N-terminal riche en sérine et thréonine, la partie centrale englobant les motifs en doigts de zinc et la partie C-terminal riche en proline. Une autre région située entre le domaine d'activation (N-terminal) et le domaine centrale a été identifiée, nommée R1. Cette région représente un site de fixation de deux corépresseurs NAB (NGFIA (Egr-1)-binding protein) de type 1 et 2. Ceux-ci répriment l'activité biologique d'Egr-1 (Pagel et al., 2011; Thiel et Cibelli, 2002). Enfin, il existe deux formes d'Egr-1: une cytoplasmique et autre nucléaire. La présence d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) au niveau du deuxième ou le troisième doigt de zinc est nécessaire pour le passage de ce facteur dans le noyau. Contrairement à la forme nucléaire d'Egr-1, la forme cytoplasmique est dépourvue du deuxième et/ou de troisième doigt de zinc, et par conséquent de son domaine NLS, ce qui empêche son passage dans le noyau (Matheny et Milbrand, 1994; Gashler et al., 1993).

I.C.2.6.2 Élément régulateurs d'Egr-1

Egr-1 est un facteur de transcription dont le gène est localisé dans le chromosome 5q23-q31 codant deux exons et un intron. La séquence promotrice du gène contient différents éléments régulateurs. Selon Sakamoto et al., on retrouve dans cette région deux sites de fixation de Sp1, cinq éléments de réponse au sérum (SRE), deux éléments de réponse à l'AMPc (CRE), trois sites de fixation d'Egr-1 (EBS) et un élément de réponse à un ester de phorbol, le tétradécanoylphorbol-acétate (TPA). Dans d'autres études, des sites de fixation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 ont aussi été identifiés (Figure 14), (Pagel et al., 2011; Thiel et Cibelli, 2002; Sakamoto, et al., 1991).

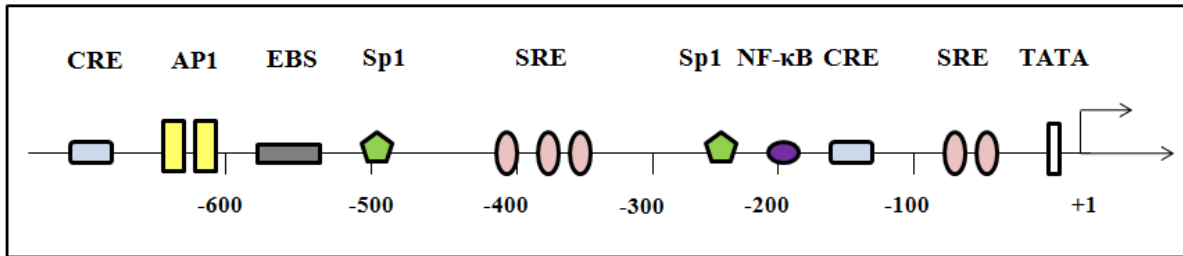


Figure 14: Les éléments régulateurs d'Egr-1. Une boîte TATA, cinq éléments de réponse au sérum (SRE), deux éléments de réponse à l'AMPc (CRE), des sites de fixation de Sp1, d'AP-1 et de NF-κB (Adapté de (Pagel et al., 2011; Thiel et Cibelli, 2002)).

Plusieurs médiateurs ont été impliqués dans la régulation de l'expression d'Egr-1 tels que les cytokines, les oncogènes et les facteurs de croissance (PDGF, EGF, FGF) et autres. L'activité de SRE dépend de la présence du facteur de réponse au sérum (SRF) et un des facteurs de la famille de TCF (Elk1, Sap1 et Sap2). SRF se lie à SRE sous forme de dimère. Sa phosphorylation n'est pas importante pour la transcription d'Egr-1. Contrairement à celui-ci, EIK1 un membre de la famille de TCF (facteurs de complexe ternaire), constitue un facteur important dans cette transcription. L'activation d'EIK1 nécessite la présence des MAP kinases. Ces dernières assurent sa phosphorylation et sa liaison au complexe SRF/SRE provoquant ainsi l'expression d'Egr-1. Concernant le CRE, son induction est liée à l'activation d'une protéine kinase dépendante de l'AMPc, la protéine kinase A (PKA). Le CRE est un site de fixation de plusieurs facteurs de transcription dont le plus important est nommé CREB. La phosphorylation de ce facteur par la PKA est à l'origine de l'activation de la transcription (Pagel et al., 2011; Thiel et Cibelli, 2002). D'autres kinases telles que CAMK et Rsk sont aussi capables de cibler CREB (Cruzalegui et al., 1999; De Cesare et al., 1988). Pour TRE, son activation n'est pas liée seulement aux éléments de réponse au TPA, mais aussi au facteur de transcription AP-1. L'activité d'AP-1 est régulée par des gènes à réponse précoce tels que c-fos et c-Jun (Hoffmann et al., 2008; Sakamoto et al., 1991). Enfin, Egr-1 peut régler négativement sa propre transcription via sa fixation sur EBS. Contrairement à l'effet des corépresseurs NABs, la suppression de l'expression d'Egr-1 par lui même est maintenue dans le temps (Thiel et Cibelli, 2002; Cao et al., 1993).

Les corépresseurs d'Egr-1 sont au nombre de deux, NAB1 et NAB2. NAB1 est exprimé de manière constitutive dans plusieurs cellules alors que NAB2 est induit par les mêmes stimuli qu'Egr-1 (Silverman et Collins, 1999). Ces deux corépresseurs sont capables de se lier sur la région R1 de la protéine Egr-1 inhibant son activité de liaison à l'ADN (Svaren et al., 1996; Russo et al., 1995). La délétion de la région R1 est à l'origine d'une forte expression d'Egr-1 (Silverman et Collins, 1999). Aussi, il a été démontré qu'Egr-1 régule positivement l'expression de ces corépresseurs (Kumbrink et al., 2005). L'effet suppressif de ces corépresseurs semble être à l'origine de leur liaison avec un complexe de remodelage de la chromatine associé à une déacetylase (NuRD) dont l'activité est répressive. Ces corépresseurs peuvent aussi affecter l'activité d'Egr-1 en empêchant son interaction avec ses coactivateurs tels que CBP et p300 (Srinivasan et al., 2006; Silverman et Collins, 1999).

L'activité transcriptionnelle d'Egr-1 peut aussi être affectée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination et la sumoylation. Le type de ces modifications joue un rôle important dans l'affinité de liaison de ce facteur à l'ADN. La phosphorylation d'Egr-1 renforce sa liaison à l'ADN et donc son activation transcriptionnelle, alors que son acétylation réprime celle-ci. De même, il a été constaté que l'activité transcriptionnelle de ce facteur peut être altérée par sumoylation en favorisant son ubiquitination, et par conséquent sa dégradation (Manente et al., 2011).

I.C.2.6.3 Rôle biologique d'Egr-1

Une étude publiée par Fu et al., a montré qu'Egr-1 est responsable de la régulation de plus de 300 gènes impliqués dans plusieurs événements physiologiques et pathologiques. Parmi ceux-ci, on retrouve TGF- β , VEGF, PPAR γ , IGF2 (Fu et al., 2003).

Le TGF- β est connu comme étant une cytokine fibrogénique impliquée dans la fibrose. Il a été démontré dans un modèle de fibrose pulmonaire, que la suppression d'Egr-1 bloque l'apoptose des cellules épithéliales médiés par TGF- β (Lee et al., 2004). Ce facteur de transcription a été aussi impliqué dans le développement du cancer de la prostate. La forte expression d'Egr-1 dans la prostate des personnes malades semble être liée à une diminution de l'expression de son corépresseur NAB2 (Abdulkadir et al., 2001). En plus, au cours de

cette maladie, on assiste à une forte production d'androgènes ainsi que leur récepteur. Egr-1 est responsable de la translocation du récepteur des androgènes à l'intérieur du noyau et sa fixation sur l'ADN des gènes cibles. Une activité transcriptionnelle augmentée de ce récepteur a été associée à la progression de cette maladie (Yang et al., 2003; Feldman et Feldman, 2001). Le rôle d'Egr-1 a été aussi détecté dans la reproduction. En effet, les souris déficientes en Egr-1 présentent une faible expression de l'hormone lutéinisante nécessaire au déclenchement de l'ovulation (Lee et al., 1996).

L'induction de l'expression d'Egr-1 par des facteurs inflammatoires comme l'IL-1 β a été détectée dans plusieurs types cellulaires, notamment celles des tissus articulaires (Tan et al., 2003). Le rôle de ce facteur dans le développement de l'OA n'est pas encore bien étudié. Cependant dans une étude de notre laboratoire, nous avons démontré que l'IL-1 β induit l'expression de la mPGES. Le traitement des chondrocytes par l'acide valproïque diminue la synthèse de cette enzyme, ce qui corrèle avec l'augmentation de l'expression du corépresseur d'Egr-1, le NAB2. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'altération de l'activité transcriptionnelle d'Egr-1 par son corépresseur et par conséquent la faible expression de la mPGES (Zayed et al., 2011). Aussi, il s'est avéré que l'induction d'Egr-1 par l'IL-1 β est associée à une diminution de la synthèse du collagène de type II, un constituant important de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire (Tan et al., 2003).

I.D Modèles d'arthrose expérimentale

Face à la difficulté d'obtenir des échantillons du cartilage des personnes arthrosiques asymptomatiques, plusieurs recherches ont été effectuées afin de développer des modèles animaux pour l'étude de l'OA. Ces modèles sont utilisés pour comprendre les mécanismes impliqués dans les phases précoces de développement de cette pathologie, l'étude de son évolution ainsi que la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques pour son traitement (Longo et al., 2012; Bendele, 2001). Chez ces modèles animaux, l'OA peut se manifester d'une façon spontanée ou par induction chirurgicale. Les deux modèles montrent des changements morphologiques qui ressemblent à ceux retrouvés chez l'humain. Toutefois, le

choix dépend de l'objectif de l'étude. Une OA spontanée permet une étude des différents stades de l'évolution de la maladie alors que pour l'OA induite expérimentalement se rapproche plus à celle rencontrée chez des patients avec des lésions traumatiques, et qui se manifeste par une dégradation rapide et plus sévère du cartilage (Bendele, 2001).

I.D.1 Modèles d'arthrose spontanée

Il est bien connu que l'OA peut se manifester de façon spontanée chez certaines espèces animales comme la souris et le cochon d'inde.

Plusieurs souches de souris sont capables de développer l'OA de manière spontanée, par exemple les souris STR/ORT, C57BL/6 et autres (Goldring, 2012). La maladie apparaît chez la majorité des animaux âgés. Comme chez l'humain, on note une augmentation des MMPs ainsi que des cytokines inflammatoires (Moore et al., 2011). Au niveau structural, elle se manifeste par une perte des constituants de la MEC, des lésions cartilagineuses, un rétrécissement de l'espace articulaire, une inflammation graduelle de la synoviale ainsi que la formation des ostéophytes (Mason et al., 2001; Evans et al., 1994; Walton, 1977). D'autre part, le modèle de la souris a joué un rôle important dans l'étude de l'implication de certains gènes dans le développement de l'OA (Longo et al., 2012; Bian et al., 2012).

Comparativement à la souris, le cochon d'inde reste le modèle d'OA spontanée le plus intéressant à cause de la taille de l'articulation ainsi que les ressemblances moléculaires et histologiques avec l'homme (Bendele et al., 1989; Bendele et Hulman, 1988). En effet, le cochon d'inde exprime la MMP-1, un médiateur catabolique absent chez la souris (Balbín et al., 2001; Huebner et al., 1998). Aussi, ce modèle exprime un marqueur précoce de l'OA retrouvé chez l'homme nommé 3-B-3 (-). Celui-ci résulte d'un changement de l'extrémité du chondroïtine sulfate. Les premiers changements histologiques sont observés dès l'âge de 3 mois. Ils sont associés à une perte de protéoglycane, une fibrillation du cartilage. À un âge plus avancé, on observe une inflammation de la membrane synoviale, un remodelage osseux et le développement des larges ostéophytes aux bords de l'articulation limitant ainsi sa mobilité (Bendele, 2002; Bendele, 2001).

I.D.2 Modèles d'arthrose induite

L'OA induite permet de reproduire les aspects pathologiques rencontrés lors des traumatismes articulaires humains. Ce type d'OA est réalisé sur de nombreuses espèces animales et selon différentes méthodes. Toutefois, l'OA semble se développer plus rapidement chez ces modèles animaux. Contrairement à l'humain, les animaux continuent à utiliser l'articulation malade. Cela conduit à une progression plus rapide de la maladie (Bendele, 2001).

- Méniscectomie

La méniscectomie est une méthode chirurgicale appliquée chez différentes espèces animales telles que la souris, le cochon d'inde, le lapin et le rat. Glasson et al., ont montré qu'une méniscectomie partielle du ménisque interne chez les souris provoque des lésions modérés à sévères 8 semaines post-chirurgie (Glasson et al., 2007). Chez le rat, l'application de cette méthode favorise une dégradation rapide du cartilage entre 3 à 6 semaines post-chirurgie. Généralement, ces lésions sont sévères et associées à la formation des ostéophytes. L'utilisation de ce modèle a permis de démontrer le rôle des inhibiteurs des MMPs dans la protection du cartilage articulaire. Néanmoins, la progression rapide de la dégradation du cartilage ne fait pas de cette espèce un modèle de choix pour étudier les différents aspects de cette pathologie (Janusz et al., 2002 ; Bendele, 2001).

Chez le cochon d'inde, la déstabilisation du ménisque interne du genou est à l'origine d'une érosion progressive du cartilage. Comme chez l'humain, l'érosion du cartilage est détectée en premier dans le compartiment médial, puis le latéral. Dès la première semaine post-chirurgie, on note une perte de protéoglycanes et des chondrocytes dans la zone superficielle du cartilage. Après 3 semaines post-chirurgie, le un tiers de cartilage du côté médial est altéré. À 12 semaines, l'érosion se propage dans les zones plus profondes du cartilage et est accompagnée par une fibrose de la membrane synoviale ainsi qu'un remodelage osseux dans les stades plus avancés. Aussi, on note des lésions modérées dans le genou non opéré qui progressent lentement (Bendele, 2001).

Contrairement à la souris, le rat et le cochon d'inde, le lapin développe l'OA dans le compartiment latéral. La déstabilisation du ménisque interne est à l'origine d'une OA modérée. Calvo et al., ont détecté une perte de protéoglycanes 4 semaines post-chirurgie. L'érosion de la surface superficielle du cartilage et le début de l'apparition d'ostéophytes sont signalés 6 semaines post-chirurgie. Durant les 8 à 10 semaines post-chirurgie, ces altérations deviennent de plus en plus prononcées (Calvo et al., 2001; Bendele, 2001). Généralement, le lapin a la capacité de régénérer le ménisque altéré durant les 6 semaines post-chirurgie, ce qui limite l'utilisation de ce modèle. Néanmoins, la sclérose de l'os sous-chondral durant les semaines qui suivent la chirurgie pourrait constituer un indicateur du bon déroulement de la chirurgie (Bendele, 2001).

- Rupture du ligament croisé antérieur

Une autre méthode chirurgicale pour induire l'OA est la rupture du ligament croisé antérieur (ACLT). Celle-ci peut être effectuée sur des petits et grands animaux. Cependant, Glasson et al., ont montré que l'application de cette méthode chez la souris favorise une dégradation rapide et sévère du cartilage associée à une érosion prononcée de l'os sous-chondral. Ces perturbations structurales ne cohérent pas avec ceux observées dans l'OA spontanée. De ce fait, cette méthode d'induction n'est pas recommandée chez la souris pour reproduire les étapes de la progression de cette maladie (Glasson et al., 2007).

Le chien avec ACLT, reste le modèle animal induit qui se rapproche le plus du processus naturel de développement de l'OA au cours des traumatismes articulaires humains. La progression de la maladie est prolongée dans le temps, ce qui permet l'étude des différentes phases de son évolution. Les lésions peuvent se localiser dans différentes régions du plateau tibial et des condyles fémoraux. La sévérité de ces lésions a été liée au degré d'atteinte du ménisque et du poids de l'animal. Les changements histologiques se traduisent par l'apparition des ostéophytes, une perte de protéoglycanes et des chondrocytes dans les zones superficielles à intermédiaires du cartilage ainsi que la fibrillation de celui-ci. Ce modèle animal présente l'opportunité d'obtenir une quantité suffisante des tissus. Aussi, il permet d'étudier l'OA dans des conditions qui se ressemblent à ceux rencontrées chez les personnes malades. Cependant, ce modèle représente quelques inconvénients, notamment un

temps lent pour la génération des lésions, la taille de l'animal ainsi que le coût relié à son entretien (Bendele, 2002 ; Bendele, 2001).

- Injection intra-articulaire

L'induction de l'OA peut aussi être effectuée par injection intra-articulaire des agents chimiques, des protéases ou des cytokines. La majorité de ces médiateurs sont à l'origine de l'apparition d'une inflammation au site d'injection, ce qui ne coïncide pas avec les premiers stades de développement de l'OA chez l'humain. Cette méthode peut être réalisée sur différents espèces animales telles que la souris, le rat et le lapin (Little et Smith, 2008; Pritzker et al., 1994). L'injection des enzymes protéolytiques contribuent au premier lieu à l'induction d'une inflammation au niveau de l'articulation qui serait à l'origine de la dégénérescence du cartilage articulaire. L'identification des médiateurs impliqués dans ces événements reste difficile à déterminer (Pritzker et al., 1994). L'injection intra-articulaire des médiateurs plus spécifiques comme l'IL-1 β , est plus facile à analyser. En effet, cette cytokine inhibe la synthèse de protéoglycanes et favorise la dégradation du cartilage en absence des événements inflammatoires (Van Beuningen et al., 1991). De ce fait, ce modèle est souvent utilisé pour étudier le rôle protecteur des inhibiteurs des MMPs (Stevens et al., 1993). La dégradation du cartilage articulaire peut aussi être induite par injection de Monosodium Iodoacetate (MIA). Ce dernier, provoque une altération du métabolisme des chondrocytes. La sévérité des lésions articulaires est dépendante des doses administrées (Guzman et al., 2003; Guingamp et al., 1997). Barve et al., ont rapporté qu'il existe une différence dans l'expression des gènes entre ce modèle et l'homme au cours de la progression de la maladie, et donc l'utilisation de ce modèle n'est pas recommandée pour l'étude de l'OA (Little et Smith, 2008, Barve et al., 2007).

Chapitre II: Travaux réalisés

Présentation

Il est bien connu que PPAR γ joue un rôle protecteur dans l'OA. Dans des travaux antérieurs de notre laboratoire, nous avons démontré que l'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire sécrétée en quantité importante dans les conditions arthrosiques, est impliquée dans la diminution de l'expression de ce récepteur nucléaire.

L'objectif général de cette thèse est de découvrir des nouvelles données scientifiques sur les mécanismes impliqués dans l'apparition de cette maladie afin de prévenir son développement et ralentir sa progression. Plus spécifiquement, nous avons cherché à identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de PPAR γ au niveau des cellules du cartilage articulaire humain. Aussi, on a analysé *in vivo* le profil d'expression des isoformes de PPARs: PPAR α , PPAR β et PPAR γ ainsi que H-PGDS et L-PGDS deux enzymes impliquées dans la production de l'agoniste naturel de PPAR γ , la 15d-PGJ2.

Pour cela, nous avons réalisé nos travaux sur deux modèles animaux d'OA, le cochon d'inde avec OA spontanée et le chien avec OA induite par ACLT. De même, nos analyses ont été effectuées sur des cultures primaires de chondrocytes et des explants du cartilage provenant des personnes normales et atteintes. Le protocole de recherche impliquant l'utilisation des échantillons du tissu humain a été approuvé par le comité d'éthique en recherche de l'hôpital Notre Dame à Montréal.

Les résultats de nos expériences, nous aideront à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les changements histologiques et moléculaires détectés au niveau du cartilage arthrosique ainsi qu'au développement de nouvelles voies thérapeutiques potentielles pour le traitement de cette maladie.

Contibution

Article I:

Prs Johanne Martel-Pelletier et Jean-Pierre Pelletier ainsi que Dr Nicolas duval nous ont permis d'obtenir les différents tissus pour réaliser nous expériences *in vitro* et *in vivo*. Ils ont participé au design et la réalisation de quelques expériences d'immunohistochimie. Drs Mohamed Benderdour et Mohit Kapoor ont réalisé les expériences de transfection ainsi que l'analyse des résultats. Dr Hassan AFIF a effectué les expériences de siRNA. Fatima Ezzahra El Mansouri, étudiante au doctorat, a fait quelques expériences de western blot et d'immunohistochime. Dr. Hassan Fahmi a contribué au design, à la conception et la coordination de l'étude ainsi que la rédaction de l'article. Pour ma part, j'ai préparé les tissus pour la culture cellulaire, j'ai réalisé quelques western blot et RT-PCR, et la majorité des expériences *in vivo* tels que la récupération des tissus, la préparation des lames ainsi que les analyses d'immunohistochimie.

Article II:

Prs Johanne Martel-Pelletier et Jean-Pierre Pelletier nous ont fournis les tissus pour réaliser des expériences *in vitro*. Drs Mohamed Benderdour et Mohit Kapoor ont effectué les expériences de transfection ainsi que l'analyse des résultats. Dr Hassan AFIF a réalisé les expériences de siRNA et du test Elisa. Fatima Ezzahra El Mansouri a participé à des expériences *in vivo*. Dr Hassan Fahmi a participé au design et la coordination de l'étude ainsi que la rédaction de l'article. Pour ma part, j'ai préparé les tissus pour la culture cellulaire, j'ai réalisé quelques western blot et RT-PCR, et des expériences *in vivo*, notamment la préparation des tissus, les expériences d'histologie et d'immunohistochimie ainsi que l'analyse des résultats.

Egr-1 contributes to IL-1-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in human osteoarthritic chondrocytes

Sarah-Salwa Nebbaki 1, Fatima Ezzahra El Mansouri¹, Hassan Afif 1, Mohit Kapoor 1, Mohamed Benderdour 2, Nicolas Duval 3, Jean-Pierre Pelletier¹, Johanne Martel-Pelletier 1 and Hassan Fahmi 1*

Author details

1 Osteoarthritis Research Unit, Research Centre of the University of Montreal Hospital Center (CR-CHUM), Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke Street East, J.A. DeSève Pavillion, Y-2628, and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H2L 4M1, Canada.

2 Research Centre, Sacré-Coeur Hospital, 5400 Gouin Boulevard West, Montreal, QC H4J 1C5, Canada.

3 Centre de Convalescence, de Charmilles Pavillion, 1487 des Laurentides Boulevard, Montreal, QC H7M 2Y3, Canada.

* Direct correspondence to: Hassan Fahmi

Publié dans: Arthritis Res Ther, 2012 Mar 28. 14(2): R69. PMID: 22455954.

Abstract

Introduction: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) has been shown to exhibit anti-inflammatory and anti-catabolic properties and to be protective in animal models of osteoarthritis (OA). We have previously shown that interleukin-1 β (IL-1) down-regulates PPAR γ expression in human OA chondrocytes. However, the mechanisms underlying this effect have not been well characterized. The PPAR γ promoter harbors an overlapping Egr-1/specificity protein 1 (Sp1) binding site. In this study, our objective was to define the roles of Egr-1 and Sp1 in IL-1-mediated down-regulation of PPAR γ expression.

Methods: Chondrocytes were stimulated with IL-1 and the expression levels of Egr-1 and Sp1 mRNAs and proteins were evaluated using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively. The role of de novo protein synthesis was evaluated using the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). The recruitment of Sp1 and Egr-1 to the PPAR γ promoter was evaluated using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. The PPAR γ promoter activity was analyzed in transient transfection experiments. The roles of Egr-1 and Sp1 were further evaluated using small interfering RNA (siRNA) approaches. The level of Egr-1 in cartilage was determined using immunohistochemistry.

Results: Down-regulation of PPAR γ expression by IL-1 requires de novo protein synthesis and was concomitant with the induction of the transcription factor Egr-1. Treatment with IL-1 induced Egr-1 recruitment and reduced Sp1 occupancy at the PPAR γ promoter. Overexpression of Egr-1 potentiated, whereas overexpression of Sp1 alleviated, the suppressive effect of IL-1 on the PPAR γ promoter, suggesting that Egr-1 may mediate the suppressive effect of IL-1. Consistently, Egr-1 silencing prevented IL-1-mediated down-regulation of PPAR γ expression. We also showed that the level of Egr-1 expression was elevated in OA cartilage compared to normal cartilage.

Conclusions: Our results indicate that induction and recruitment of Egr-1 contributed to the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression. They also suggest that modulation of Egr-1 levels in the joint may have therapeutic potential in OA.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease and is a leading cause of disability in developed countries and throughout the world. Clinical manifestations of OA may include pain, stiffness, and reduced joint motion. Pathologically, OA is characterized by progressive degeneration of articular cartilage, synovial inflammation, and subchondral bone remodeling. It is also characterized by increased levels of inflammatory mediators, among which interleukin 1 (IL-1) is considered a key player in the initiation and progression of the disease [1]. The mechanisms through which IL-1 exerts its effects include increased expression of inflammatory genes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase 2 (COX-2), microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1), and the release of nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2) [1]. IL-1 also promotes cartilage degradation by suppressing the synthesis of the major components of extracellular matrix proteoglycan and collagen and by enhancing the production of matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases [1].

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of transcription factors belonging to the nuclear hormone receptor superfamily, which includes receptors for steroids, thyroid hormone, vitamin D, and retinoic acid. Three PPAR isoforms have been identified: PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ [2]. PPAR α , present primarily in the liver, heart, and muscle, plays a central role in the regulation of fatty acid metabolism [3]. PPAR β/δ is ubiquitously expressed and has been suggested to participate in various physiological processes such as lipid homeostasis, epidermal maturation, tumorigenesis, wound healing, and brain development [4]. PPAR γ , the most thoroughly studied member of the PPAR family, exists as two forms as a result of differential splicing: PPAR γ 1 and PPAR γ 2. PPAR γ 1 is expressed in several tissues and cell types, whereas PPAR γ 2 is found mainly in adipose tissues. PPAR γ plays important modulatory roles in lipid and glucose metabolism, cellular differentiation, vascular function, and immunoregulation and has been implicated in various conditions, including inflammation, atherosclerosis, and cancer [5-7].

There is increasing evidence that PPAR γ also plays an important role in the pathophysiology of OA and other arthritic articular diseases [8]. Activation of PPAR γ inhibits IL-1-induced NO and PGE2 production as well as iNOS and COX-2 expression in human and rat

chondrocytes [9-12]. PPAR γ activation was also shown to suppress the induction of mPGES-1, which catalyzes the terminal step in PGE₂ synthesis [13, 14]. In addition to having effects on inflammatory responses, PPAR γ activation modulates several events involved in cartilage destruction. For instance, PPAR γ activation was demonstrated to inhibit IL-1-induced MMP-1, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 expression [9, 15, 16] as well as IL-1-mediated proteoglycan degradation [11]. Moreover, PPAR γ activation was reported to prevent IL-1-mediated degradation of type II collagen in human OA cartilage explants [16]. Additional in vitro studies demonstrated that PPAR γ activation suppressed several inflammatory and catabolic responses in synovial fibroblasts, including the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-8, MMP-1, and MMP-3 [17-19] and the expression of iNOS, cytosolic phospholipase A2 (cPLA2), COX-2, and mPGES-1 [20-22]. Finally, the protective effects of PPAR γ in OA have been proven in vivo in animal models of the disease. In this context, we have demonstrated that PPAR γ activators reduced the size, depth, and histological severity of cartilage lesions in two models of OA: the partial medial meniscectomy in guinea pigs [23] and anterior cruciate ligament transection in dogs [24]. We previously showed that IL-1 suppresses PPAR γ expression in human OA chondrocytes [25]; however, the underlying signaling mechanisms remained undefined. The PPAR γ proximal promoter contains an overlapping binding site for the transcription factors Egr-1 (early growth response gene 1) and Sp1 (specificity protein 1). In the present study, we demonstrated that Egr-1 contributes to the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression, likely through displacement of prebound Sp1.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Human recombinant IL-1 was obtained from Genzyme (Cambridge, MA, USA). Aprotinin, leupeptin, pepstatin, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), cycloheximide (CHX), and sodium orthovanadate (Na₃VO₄) were from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin and streptomycin, fetal calf serum (FCS), and Trizol reagents were supplied by Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Antibodies against Egr-1, Sp1, and b-actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa

Cruz, CA, USA). The antibody against PPAR γ was from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) with horseradish peroxidase (HRP) was from Pierce (Rockford, IL, USA).

Specimen selection and chondrocyte culture

Human normal cartilage (from femoral condyles) was obtained at necropsy, within 12 hours of death, from donors with no history of arthritic diseases (n = 12, mean \pm standard deviation (SD) age: 61 \pm 14 years). To ensure that only normal tissue was used, cartilage specimens were thoroughly examined both macroscopically and microscopically. Only those with neither alteration were further processed. Human OA cartilage was obtained from patients undergoing total knee replacement (n = 31, mean \pm SD age: 66 \pm 15 years). In all patients, OA was diagnosed on the basis of criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA [26]. At the time of surgery, the patients had symptomatic disease requiring medical treatment in the form of non-steroidal anti-inflammatory drugs or selective COX-2 inhibitors. Patients who had received intraarticular injections of steroids were excluded. The Clinical Research Ethics Committee of Notre-Dame Hospital approved the study protocol and the use of human articular tissues. Informed consent was obtained from each donor or from an authorized third party.

Chondrocytes were released from cartilage by sequential enzymatic digestion as previously described [25]. Cells were seeded at 3.5×10^5 cells per well in 12-well culture plates (Costar, Corning, NY, USA) or at 6 to 7×10^5 cells per well in six-well culture plates in DMEM supplemented with 10% FCS and were cultivated at 37°C for 48 hours. Cells were washed and incubated for an additional 24 hours in DMEM containing 0.5% FCS before stimulation with IL-1.

Western blot analysis

Chondrocytes were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM PMSF, 10 μ g/mL each of aprotinin, leupeptin, and pepstatin, 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, and 1 mM NaF). Lysates were sonicated on ice and centrifuged at 12,000 revolutions per minute for 15 minutes. The protein

concentration of the supernatant was determined by using the bicinchoninic acid method (Pierce). Twenty micrograms of total cell lysate was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). After blocking in 20 mM Tris- HCl pH 7.5 containing 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, and 5% (wt/vol) non-fat dry milk, blots were incubated overnight at 4°C with the primary antibody and washed with a Tris buffer (Tris-buffered saline (TBS) pH 7.5 with 0.1% Tween 20). The blots were then incubated with HRP-conjugated secondary antibody (Pierce), washed again, incubated with SuperSignal Ultra Chemiluminescent reagent (Pierce), and exposed to Kodak X-Omat film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

RNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Total RNA from cultured chondrocytes or cartilage was isolated by using the TRIzol reagent (Invitrogen) in accordance with the instructions of the manufacturer. To remove contaminating DNA, isolated RNA was treated with RNase-free DNase I (Ambion, Austin, TX, USA). The RNA was quantitated by using a RiboGreen RNA quantitation kit (Molecular Probes Inc., now part of Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), dissolved in diethylpyrocarbonate-treated H₂O, and stored at -80°C until use. One microgram of total RNA was reverse-transcribed by using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, ON, Canada) as detailed in the guidelines of the manufacturer. One fiftieth of the reverse transcriptase reaction was analyzed by realtime polymerase chain reaction (PCR) as described below. The following primers were used: PPAR γ , sense, 5'-AAAGAAGCCAACACTAAACC-3' and antisense, 5'-CTTCCATTA- CGGAGAGATCC-3'; Egr-1, sense, 5'-CTGAC CGCAGAGTCTTTTC- CTG-3' and antisense, 5'-TGGGTGCCGCTGAGTAAATG-3'; Sp1, sense 5'-AAACATATCAA-AGACCCACCAGAAT-3' and antisense 5'-ATATT-GGTGGTAATAAGGGCTGAA-3'; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), sense 5'-CAGAACA-TCATCCCTGCCTCT-3' and antisense 5'-GCTTGA- CAAAGTGGTCGTTGAG-3'.

Real-time polymerase chain reaction

Real-time PCR analysis was performed in a total volume of 50 μ L containing template DNA, 200 nM of sense and antisense primers, 25 μ L of SYBR[®] Green master mix (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and uracil-N-glycosylase (UNG) (0.5 Units; Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). After incubation at 50°C for 2 minutes (UNG reaction) and at 95°C for 10 minutes (UNG inactivation and activation of the AmpliTaq Gold enzyme), the mixtures were subjected to 40 amplification cycles (15 seconds at 95°C for denaturation and 1 minute for annealing and extension at 60°C). Incorporation of SYBR[®] Green dye into PCR products was monitored in real time by using a GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and allowing determination of the threshold cycle (CT) at which exponential amplification of PCR products begins. After PCR, dissociation curves were generated with one peak, indicating the specificity of the amplification. ACT value was obtained from each amplification curve by using the software provided by the manufacturer (Applied Biosystems).

Relative mRNA expression in chondrocytes was determined by using the $\Delta\Delta$ CT method, as detailed in the guidelines of the manufacturer (Applied Biosystems). $\Delta\Delta$ CT value was first calculated by subtracting the CT value for the housekeeping gene GAPDH from the CT value for the gene of interest. A Δ CT value was then calculated by subtracting the Δ CT value of the control (unstimulated cells) from the Δ CT value of each treatment. Fold changes compared with the control were then determined by raising 2 to the $-\Delta\Delta$ CT power. Each PCR generated only the expected specific amplicon as shown by the melting temperature profiles of the final product and by gel electrophoresis of test PCRs. Each PCR was performed in triplicate on two separate occasions for each independent experiment.

Chromatin immunoprecipitation assay

The chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were performed according to the ChIP protocol provided by Upstate/Millipore Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA) and previously published protocols [27]. After treatment, the cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature. The fixed cells were washed twice with

ice-cold phosphate-buffered saline containing protease inhibitors and then lysed for 10 minutes at 1×10^6 cells per 200 μL of SDS lysis buffer (50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.5% SDS, 100 mM NaCl, and 5 mM EDTA) plus protease inhibitors. The chromatin samples were sonicated to reduce DNA length to 200 to 500 base pairs (bp). Twenty microliters of the supernatant was saved as the input DNA, and the remainder was diluted 1:10 in ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, and 16.7 mM Tris-Cl) containing protease inhibitors. The chromatin samples were precleared with a salmon sperm DNA/protein A-agarose 50% gel slurry for 3 hours. The samples were then immunoprecipitated overnight at 4°C with antibodies specific for either Sp1 and Egr-1. As negative controls, cross-linked chromatin was incubated overnight with control Ig or in the absence of antibody. Immune complexes were recovered by addition of salmon sperm DNA/protein A-agarose slurry for 2 hours at 4°C . The immune complexes were sequentially washed three times each (5 minutes on a rotating platform), with low salt, high salt, lithium chloride, and Tris/EDTA buffers, and eluted twice with 250 μL of 1% SDS and 0.1 M NaHCO_3 for 15 minutes. The eluted material and the DNA input samples were heated for 4 hours at 65°C to reverse crosslinking. The samples were treated with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNasefree proteinase K for 1 hour at 45°C , extracted with phenol- chloroform-isoamyl alcohol and chloroform, and ethanol-precipitated in the presence of 20 μg of glycogen. Pellets were suspended in 25 to 30 μL of H_2O and subjected to PCR analysis. The primer sequences used were PPAR γ sense, 5'-TCGGATCCCTCCTCGGAAATGG-3' and antisense, 5'-GCGCGACTGGGAGG-GA 3'.

Transient transfection

The luciferase reporter construct pGL3-PPAR γ 1p3000, containing a 3,000-bp fragment of the human PPAR γ 1 gene promoter, was kindly provided by Johan Auwerx (Institut de Génétique et de Biologie moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France). Egr-1 expression vector (pcDNA3) was donated by Yuqing Chen (Morehouse School of Medicine, Atlanta, GA, USA) [28]. The b-galactosidase reporter vector under the control of SV40 promoter (pSV40-b-gal) was from Promega Corporation (Madison, WI, USA). Transient transfection experiments were performed by using the FuGene-6 transfection reagent in accordance with the recommended

protocol of the manufacturer (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Briefly, chondrocytes were seeded 24 hours prior to transfection at a density of 3×10^5 cells per well in 12-well plates and transiently transfected with 1 μg of the PPAR γ promoter construct and 0.5 μg of the internal control pSV40-b-gal. Six hours later, the medium was replaced with DMEM containing 1% FCS. At 1 day after transfection, the cells were left untreated or treated with IL-1 (100 pg/mL) for 20 hours. In the overexpression experiments, the amount of transfected DNA was kept constant by using the corresponding empty vector. At the end of the indicated treatment, the cells were washed twice in ice-cold phosphatebuffered saline (PBS) and extracts were prepared for firefly luciferase reporter assay (Promega Corporation). Luciferase activity was normalized for transfection efficiency by using the corresponding b-galactosidase activity.

RNA interference

Specific small interfering RNA (siRNA) for Sp1, Egr-1, or scrambled control was obtained from Dharmacon Inc. (Lafayette, CO, USA). Chondrocytes were seeded in six well plates at 6×10^5 cells per well and incubated for 24 hours. Cells were transfected with 100 nM of siRNA by using the HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) in accordance with the recommendations of the manufacturer. The medium was changed 24 hours later, and the cells were incubated for an additional 24 hours before stimulation with 100 pg/mL IL-1 for 1 or 20 hours.

Immunohistochemistry

Cartilage specimens were processed for immunohistochemistry as previously described [25]. The specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 μm) of paraffin-embedded specimens were deparaffinized in toluene and dehydrated in a graded series of ethanol. The specimens were then preincubated with chondroitinase ABC (0.25 U/mL in PBS pH 8.0) for 60 minutes at 37°C followed by a 30-minute incubation with Triton X-100 (0.3%) at room temperature. Slides were then washed in PBS followed by incubation with 2% hydrogen peroxide/methanol for 15 minutes. They were further incubated for 60 minutes with 2% normal serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and

overlaid with an anti-Egr-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 18 hours at 4°C in a humidified chamber. Each slide was washed three times in PBS pH 7.4 and stained by using the avidin biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). The color was developed with 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) containing hydrogen peroxide. The slides were counterstained with eosin. The specificity of staining was evaluated by using an antibody that had been preadsorbed (1 hour at 37°C) with a 20-fold molar excess of the protein fragment corresponding to amino acids 500 to 550 of human Egr-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and by substituting the primary antibody with non-immune rabbit IgG (Chemicon, Temecula, CA, USA), used at the same concentration as the primary antibody. The evaluation of positive-staining chondrocytes was performed by using our previously published method [25]. For each specimen, six microscopic fields were examined under 40× magnification. 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).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SD. Statistical significance was assessed by the two-tailed Student t test. *P* values of less than 0.05 were considered significant.

Results

Downregulation of PPAR γ expression by IL-1 requires de novo protein synthesis

First, we investigated whether IL-1-mediated downregulation of PPAR γ expression in chondrocytes requires de novo protein synthesis. Chondrocytes were incubated with cycloheximide (10 μ g/mL) for 30 minutes prior to stimulation with 100 pg/mL IL-1 for 18 hours, and the levels of PPAR γ mRNA were analyzed by real-time PCR. Changes in PPAR γ mRNA gene expression were evaluated as percentage over control (untreated cells) after normalization to the internal control gene, GAPDH. As shown in Figure 1, stimulation with IL-1 down-regulated PPAR γ mRNA expression to approximately 80% of control (bar 2 versus bar 1), confirming our earlier findings [25]. Treatment with CHX prevented IL-1-mediated suppression of PPAR γ mRNA expression (bar 4 versus bar 2), suggesting that the

suppressive effect of IL-1 on PPAR γ was an indirect effect and was dependent on *de novo* protein synthesis.

Downregulation of PPAR γ expression by IL-1 correlated with increased Egr-1 expression

Analysis of the PPAR γ promoter identified a putative Egr-1-binding site, which overlaps with a Sp1-binding site, between nucleotide-184 and -173 relative to the transcription start site. To evaluate the role of these transcription factors in the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression, we first examined the effect of IL-1 on their expression in chondrocytes. Cells were treated with IL-1 for different time periods, and the levels of Egr-1 mRNA were quantified by using real-time reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). IL-1-induced changes in gene expression were evaluated as fold over control (untreated cells) after normalization to the internal control gene, GAPDH. As shown in Figure 2a, treatment with IL-1 enhanced Egr-1 mRNA expression in a time-dependent manner. Egr-1 mRNA was rapidly and significantly induced at 0.5 hours post-stimulation with IL-1, reached the maximum at 1 hour, and started to decrease at 2 hours. Next, we performed Western blot analysis to determine whether changes in mRNA levels were paralleled by changes in Egr-1 protein levels. Consistent with its effects on Egr-1 mRNA, IL-1 induced Egr-1 protein expression in a time-dependent manner (Figure 2d). Egr-1 protein levels were significantly increased by 0.5 hours post-stimulation, further increased up to 1 hour, then gradually declined starting at 2 hours, and reached basal levels at 8 hours. The induction of Egr-1 mRNA by IL-1 was also dose-dependent (data not shown). These results indicated that IL-1 is a potent inducer of Egr-1 mRNA and protein expression in human chondrocytes. In contrast, IL-1 had no significant effect on the expression levels of Sp1 mRNA and protein (Figure 2b,e). Importantly, the induction of Egr-1 protein expression by IL-1 preceded the suppression of PPAR γ expression (Figure 2c,f). The correlation between the downregulation of PPAR γ expression and the induction of Egr-1 suggests a link between these two events.

IL-1 induced the recruitment of Egr-1 and decreased Sp1 occupancy at the PPAR γ promoter

To determine whether Egr-1 and Sp1 proteins physically interact with the PPAR γ promoter in vivo, we performed ChIP assays. Chondrocytes were stimulated with IL-1 for various time periods, and formaldehyde-cross-linked DNA-proteins were immunoprecipitated by using antibodies specific to Egr-1 and Sp1. Control Ig and no antibody were used as controls. DNA isolated from the immunoprecipitates was analyzed by real-time PCR by using primers amplifying the PPAR γ promoter region (bp -322 to -139) that harbors the overlapping Sp1/Egr-1 site.

As shown in Figure 3b, treatment with IL-1 enhanced the levels of Egr-1 at the PPAR γ promoter in a time-dependent manner. It started to increase significantly at 1 hour after IL-1 stimulation, reached a maximum at 2 hours, and returned to a near basal level by 8 hours. In contrast, the levels of Sp1 at the PPAR γ promoter decreased after IL-1 stimulation (Figure 3c). Sp1 levels were significantly decreased by 2 hours after stimulation, with a further decrease at 4 hours, and remained downregulated until the 18-hour time point. No immunoprecipitable PPAR γ promoter DNA was detected with the control Ig and no antibody controls (data not shown).

The recruitment of Egr-1 and reduced occupancy of Sp1 at the PPAR γ promoter preceded the suppression of PPAR γ transcription by IL-1, suggesting that the recruitment of Egr-1 mediates PPAR γ downregulation. Taken together, these results strongly suggest that IL-1-mediated downregulation of PPAR γ involves the recruitment of Egr-1 and reduced occupancy of Sp1.

Overexpression of Egr-1 suppressed, whereas that of Sp1 enhanced, PPAR γ promoter activity

To further characterize the functional roles of Sp1 and Egr-1 in IL-1-mediated downregulation of PPAR γ expression, we performed transient transfection experiments in which we examined the effects of Egr-1 and Sp1 on PPAR γ promoter activity. Chondrocytes were transiently co-transfected with the PPAR γ promoter and increasing concentrations of

expression vectors that encode Sp1 or Egr-1, and at 18 hours post-transfection, the cells were left untreated or stimulated with IL-1 for an additional 18 hours.

As shown in Figure 4a, treatment with IL-1 suppressed PPAR γ promoter activity (bar 5 versus bar 1), consistent with previous data [25]. Overexpression of Egr-1 had no significant effect on the basal PPAR γ promoter activity (bars 2 to 4) but dose-dependently potentiated the suppressive effect of IL-1 (bars 6 to 8). These data suggest that Egr-1 mediates the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression. In contrast, overexpression of Sp1 slightly enhanced (bars 2 to 4) the basal activity of the PPAR γ promoter and prevented (bars 6 to 8) the suppressive effect of IL-1 on the PPAR γ promoter activity (Figure 4b). These data corroborate the CHIP data, suggesting that Egr-1 mediates the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression, likely by competing with endogenous Sp1.

Egr-1 silencing with siRNA mitigated IL-1-mediated suppression of PPAR γ expression

To further confirm the role of Egr-1, we examined the impact of its silencing by siRNA on IL-1-mediated downregulation of PPAR γ protein expression. Chondrocytes were transfected with the scrambled control siRNA, siRNA for Sp1, or siRNA for Egr-1, and after 48 hours of transfection, the cells were stimulated or not with IL-1 for 1 or 18 hours. As shown in Figure 5, transfection with Egr-1 siRNA reversed the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ . In contrast, transfection with Sp1 siRNA or with scrambled control siRNA had no effect. Sp1 protein levels were reduced by as much as 70% to 75%, and Egr-1 protein levels were almost completely suppressed, confirming silencing of both genes (Figure 5). Together, these data clearly show that Egr-1 is required for IL-1-mediated downregulation of PPAR γ protein expression.

Egr-1 levels are elevated in osteoarthritis cartilage

To determine whether Egr-1 levels were altered under OA conditions, we analyzed the levels of Egr-1 mRNA in total cartilage from normal (n = 9) and OA (n = 9) donors by using real-time quantitative RT-PCR. As shown in Figure 6a, the level of Egr-1 mRNA was approximately 3.5-fold higher in OA cartilage compared with normal cartilage. Next, we used immunohistochemistry to analyze the localization and the expression level of Egr-1 protein in

normal and OA cartilage. As shown in Figure 6c and 6d, Egr-1 was expressed primarily in chondrocytes of the superficial and upper intermediate zones of the cartilage. Statistical evaluation for the cell score revealed that the percentage of cells expressing Egr-1 was approximately 3-fold higher in OA cartilage (n = 9) compared with normal cartilage (n =9). The specificity of the staining was confirmed by using an antibody that had been preadsorbed (1 hour at 37°C) with a 20-fold molar excess of the peptide antigen or non-immune control IgG (data not shown). Together, these data indicate that the expression level of Egr-1 is increased in OA cartilage.

Discussion

The transcription factor PPAR γ has been shown to modulate a number of inflammatory and catabolic responses in articular joint tissues and was suggested to be protective in OA and other arthritic diseases [14-32]. Although many stimuli have been reported to regulate the expression of PPAR γ in several cell types (including chondrocytes) [8], little is known about the details of the exact mechanisms that govern its expression.

In the present study, we investigated the roles of the transcription factors Egr-1 and Sp1 in the downregulation of PPAR γ expression by IL-1. We demonstrated that IL-1-mediated downregulation of PPAR γ coincided with the induction of Egr-1 expression. In addition, downregulation of PPAR γ expression was preceded by Egr-1 recruitment to, and concomitant reduced Sp1 occupancy at, the PPAR γ promoter. Overexpression of Egr-1 suppressed, whereas that of Sp1 enhanced, PPAR γ promoter activity. Furthermore, Egr-1 silencing prevented the downregulation of PPAR γ expression by IL-1. Together, these data indicate that Egr-1 mediates the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression, likely through displacement of Sp1.

The PPAR γ promoter contains an overlapping Sp1/Egr-1-binding site. The transcription factor Sp1 is ubiquitously expressed in cell lines and tissues and generally functions as an activator of transcription [29]. The transcription factor Egr-1 is not expressed in normal tissues but is rapidly induced by inflammatory cytokines and growth factors [30-33]. In promoters containing overlapping Sp1/Egr-1-binding sites, Egr-1 can function as a

transcriptional activator or repressor. For example, Egr-1 has been shown to compete with Sp1 for an overlapping region in the promoter of platelet-derived growth factor- A (PDGF-A) and activates transcription in vascular endothelial cells [34]. Egr-1-mediated transcriptional activation through displacement of Sp1 was also observed for N-myc downregulated gene (NDRG1) [35] and tissue factor [36]. In contrast, other studies reported that Egr-1 competes with Sp1 and represses the transcription of a number of genes, including the β -adrenergic receptor [37], protein tyrosine phosphatase 1B [38], sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) [39], the adenosine 5'-triphosphate-binding cassette transporter 2 (ABCA2) [40], and type II collagen [31].

Here, we found that treatment of chondrocytes with IL-1 led to a time-dependent increase in Egr-1 expression, whereas the expression of Sp1 was not altered. This is consistent with previous studies showing that IL-1 is a potent inducer of Egr-1 expression in the chondrocyte cell line C-28/I2 [31]. We then examined the effect of IL-1 on the recruitment of Egr-1 and Sp1 to the PPAR γ promoter. ChIP results demonstrated that IL-1 induced Egr-1 recruitment to the PPAR γ promoter with a parallel reduction in Sp1 occupancy, indicating that Egr-1 displaced the binding of Sp1. It is noteworthy that these changes at the PPAR γ promoter were concomitant with the decrease in PPAR γ expression, suggesting that Egr-1 recruitment to the PPAR γ promoter could mediate the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression.

Using reporter gene assays, we found that IL-1 downregulated PPAR γ promoter activity and this effect was further potentiated by co-transfection with an expression vector for Egr-1. In contrast, Sp1 overexpression mitigated the suppressive effect of IL-1. This confirms the respective negative and positive regulation of the PPAR γ promoter by Egr-1 and Sp1.

It should be noted that, in the absence of IL-1, transfection with Egr-1 had no effect on PPAR γ promoter activity, indicating that Egr-1 needs to be activated to achieve inhibition of PPAR γ promoter activity. In this context, it has been reported that the effects of Egr-1 on transcription are modulated through its phosphorylation by casein kinase II [41] and extracellular signal-regulated kinase (Erk) [42]. Egr-1 activity can also be regulated through acetylation, methylation, and ubiquitination, which are known for their impact on the activity of a number of proteins, including transcription factors. Indeed, Egr-1 harbors several

consensus sites for acetylation and methylation. Further studies are needed to determine whether the repressive effect of Egr-1 on PPAR γ expression involves such post-translational modifications.

Collectively, these results strongly suggest that the induction of Egr-1 expression and its recruitment to the PPAR γ promoter mediate the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression. This is further supported by the fact that siRNA-mediated silencing of Egr-1 blocked IL-1- induced downregulation of PPAR γ protein expression.

There are a number of potential mechanisms through which Egr-1 could mediate the downregulation of PPAR γ expression by IL-1. The first possibility is that Egr-1 can repress transcription by displacing prebound Sp1. This is corroborated by our finding that the recruitment of Egr-1 to the PPAR γ promoter paralleled reduced Sp1 occupancy. Moreover, several studies have shown that, through competition with promoter-associated Sp1, Egr-1 represses transcription of genes that harbor overlapping binding sites for Egr-1/Sp1 [34-36]. Secondly, Egr-1 may inhibit PPAR γ expression through direct binding to Sp1 and inhibition of its transcriptional activity. In this context, Egr-1 has been shown to inhibit Sp1 transcriptional activity, independently of DNA binding, through mechanisms that involve protein-protein interactions [41]. Thirdly, Egr-1 can also repress transcription by interfering with the interaction between Sp1 and TATABinding proteins (TBPs). Indeed, Sp1 has been shown to interact with TBPs [43], and Egr-1 was reported to inhibit the binding of TBPs to target promoters [44]. Finally, Egr-1 can attenuate Sp1 activities by competing for limited amounts of general transcriptional co-activators. Of note, Egr-1 has been reported to repress transcription by disrupting the interaction between Sp1 and CREBbinding protein (CBP/p300) [31]. It is noteworthy that the overlapping binding site for Sp1 and Egr-1 in the PPAR γ promoter can also bind the transcription factor Sp3. Indeed, Sp3 and Sp1 recognize and bind to the same DNA element with similar affinity and their DNA-binding domains share over 90% DNA sequence homology. Therefore, it is possible that Sp3 contributes to the regulatory effect of IL-1 on PPAR γ expression. Indeed, IL-1 induces Sp3 expression and Sp3 down-regulates the transcriptional activity of Sp1 in chondrocytes. Such a mechanism was documented in IL-1-induced downregulation of type II transforming growth factor-beta

(TGF- β) receptor [45]. In addition to containing the overlapping Sp1/Egr-1- binding sites, the PPAR γ promoter contains binding sites for other transcription factors known to be activated by IL-1, including activation protein-1 (AP-1), nuclear factor-kappa- B (NF- κ B), nuclear factor of activated T cells (NFAT), and myogenic differentiation 1 (MyoD). Although the role of these elements in IL-1-mediated downregulation of PPAR γ expression is still unknown, we cannot exclude the possibility that activation of these transcription factors by IL-1 also participates in the downregulation of PPAR γ expression. This is supported by the observation that siRNA-mediated silencing of Egr-1 did not completely reverse the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression.

The involvement of Egr-1 in IL-1-mediated downregulation of PPAR γ expression may be of relevance for other stimuli known to modulate PPAR γ expression. For instance, TNF- α and oxidative stress are known to down-regulate PPAR γ expression [46,47]. Interestingly, TNF- α and oxidative stress are potent inducers of Egr-1 expression [30,48]. Therefore, it is possible that the induction of Egr-1 expression is part of the mechanisms by which TNF- α and oxidative stress down-regulate PPAR γ expression.

Several studies have suggested roles for Egr-1 in the regulation of several genes involved in the pathogenesis of arthritis. For example, Egr-1 was shown to mediate TNF- α -induced MMP-9 [32], IL-1-mediated suppression of type II collagen [31], and TNF- α -mediated suppression of aggrecan [33]. Egr-1 was also shown to positively regulate several inflammatory responses. Indeed, Egr-1 mediates IL-1-induced mPGES-1 expression and PGE2 production in several cell types, including chondrocytes and synovial fibroblasts [22]. Furthermore, Egr-1 contributes to lipopolysaccharide-induced transcription of suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1), a key regulator of lipopolysaccharide-induced cytokine production [49]. Egr-1 was also demonstrated to play a critical role in the induction of a number of chemokines [50] and cytokines, including IL-2, TNF- α [51], IL-6, granulocyte colony-stimulating factor, and intracellular adhesion molecule [52]. In addition to inflammatory and catabolic responses, chondrocyte apoptosis plays a significant role in the pathogenesis of OA. Of importance, Egr-1 was shown to positively regulate the expression of several pro-apoptotic factors, including TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

[53] and phosphatase and tensin homolog (PTEN) [54]. These data, together with our findings that Egr-1 mediates the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression, suggest that therapeutic interventions that control Egr-1 expression may have protective effects in OA. Further in vivo studies will be required to elucidate the exact role of Egr-1 in cartilage integrity and the pathogenesis of OA.

Finally, we showed that OA cartilage expresses high levels of Egr-1 compared with normal tissue. Positive immunoreactive staining for Egr-1 was located primarily in chondrocytes of the superficial layers. Interestingly, the levels of IL-1, a key player in the pathogenesis of OA, were reported to be elevated in these regions [55], suggesting that IL-1 may be responsible for the observed increase in Egr-1 in OA cartilage. This is consistent with our findings that IL-1 is a potent inducer of Egr-1 expression in cultured chondrocytes. Our results are consistent with the findings of Trabant and colleagues [56], who showed elevated Egr-1 expression in rheumatoid synovium, which is characterized by increased production of inflammatory cytokines. In contrast, Wang and colleagues [57] reported reduced expression of Egr-1 in OA cartilage. These apparent discrepancies in the expression of Egr-1 may be due to differences in study design. Indeed, Wang and colleagues [57] performed their immunohistochemical study by using cartilage from two donors: one OA and one normal. The discrepancies may also lie in differences in tissue processing, antibody concentrations, or staining detection methodology.

Conclusions

These data suggest that Egr-1 mediates the suppressive effect of IL-1 on PPAR γ expression through a mechanism involving displacement of prebound Sp1. They also suggest that this pathway could be a potential target for pharmacologic intervention in the treatment of OA and possibly other arthritic diseases.

Abbreviations

Bp: base pairs; ChIP: chromatin immunoprecipitation; CHX: cycloheximide; COX-2: cyclooxygenase-2; CT: threshold cycle; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; Egr-1: early growth response gene 1, FCS: fetal calf

serum; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HRP: horseradish peroxidase; IgG: immunoglobulin G; IL: interleukin; iNOS: inducible nitric-oxide synthase; MMP: matrix metalloproteinase; mPGES-1: microsomal prostaglandin E synthase 1; NO: nitric oxide; OA: osteoarthritis; PBS: phosphate-buffered saline; PCR: polymerase chain reaction; PGE2: prostaglandin E2; PMSF: phenylmethylsulphonyl fluoride; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction; SD: standard deviation; siRNA: small interfering RNA; Sp1: specificity protein 1; TBP: TATA-binding protein; TNF α : tumor necrosis factor-alpha; UNG: uracil-N-glycosylase.

Acknowledgements

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-84282 and the Fonds de la Recherche du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). The authors thank Virginie Wallis for her editorial assistance.

Authors' contributions

S-SN designed and carried out cell and real-time RT-PCR experiments and some immunoblotting experiments. FEE contributed to the study design and carried out immunoblotting experiments. HA performed siRNA and some immunohistochemistry experiments. MK and MB performed transient transfection experiments and participated in data analysis. JM-P, J-PP, and ND helped to obtain tissues and participated in the study design and in some immunohistochemistry experiments. HF conceived, designed, and coordinated the study, carried out some cell experiments, and drafted the manuscript. All authors contributed to the analysis and interpretation of data and read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H: Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011, 7:33-42.
2. Montagner A, Rando G, Degueurce G, Leuenberger N, Michalik L, Wahli W: New insights into the role of PPARs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011, 85:235-243.
3. Hiukka A, Maranghi M, Matikainen N, Taskinen MR: PPARalpha: an emerging therapeutic target in diabetic microvascular damage. *Nat Rev Endocrinol* 2010, 6:454-463.
4. Hall MG, Quignodon L, Desvergne B: Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta in the brain: facts and hypothesis. *PPAR Res* 2008, 2008:780452.
5. Wang D, DuBois RN: Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptors in chronic inflammation and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2010, 39:697-707.
6. Wang N, Yin R, Liu Y, Mao G, Xi F: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in atherosclerosis: an update. *Circ J* 2011, 75:528-535.
7. Youssef J, Badr M: Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol* 2011, 164:68-82.
8. Fahmi H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Kapoor M: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2011, 21:1-9.
9. 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, 44:595-607.
10. Fahmi H, Pelletier JP, 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, 10:845-848.
11. Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauca M, Netter P, Terlain B: Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem* 2000, 275:12243-12250.
12. Moulin D, Poleni PE, Kirchmeyer M, Sebillaud S, Koufany M, Netter P, Terlain B, Bianchi A, Jouzeau JY: Effect of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on prostaglandins cascade in joint cells. *Biorheology* 2006, 43:561-575.

13. Li X, Afif H, Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Fahmi H: Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol* 2005, 32:887-895.
14. Bianchi A, Moulin D, Sebillaud S, Koufany M, Galteau MM, Netter P, Terlain B, Jouzeau JY: 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-Delta12,14-prostaglandin J2. *Arthritis Res Ther* 2005, 7:R1325-1337.
15. Francois M, Richette P, Tsagris L, Raymondjean M, Fulchignoni-Lataud MC, Forest C, Savouret JF, Corvol MT: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma down-regulates chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element. *J Biol Chem* 2004, 279:28411-28418.
16. Chabane N, Zayed N, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Fahmi H: Human articular chondrocytes express 15-lipoxygenase-1 and -2: potential role in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009, 11:R44.
17. Ji JD, Cheon H, Jun JB, Choi SJ, Kim YR, Lee YH, Kim TH, Chae IJ, Song GG, Yoo DH, Kim SY, Sohn J: Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun* 2001, 17:215-221.
18. Simonin MA, Bordji K, Boyault S, Bianchi A, Gouze E, Becuwe P, Dauca M, Netter P, Terlain B: PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282: C125-133.
19. Fahmi H, Pelletier JP, Di Battista JA, Cheung HS, Fernandes J, Martel-Pelletier J: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts by reducing the activity of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage* 2002, 10:100-108.
20. Tsubouchi Y, Kawahito Y, Kohno M, Inoue K, Hla T, Sano H: Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 283:750-755.
21. Farrajota K, Cheng S, Martel-Pelletier J, Afif H, Pelletier JP, Li X, Ranger P, Fahmi H: Inhibition of interleukin-1beta-induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum* 2005, 52:94-104.
22. Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, Lavigne M, Fahmi H: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J Biol Chem* 2004, 279:22057-22065.

23. 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.
24. 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.
25. Afif H, Benderdour M, Mfuna-Endam L, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Fahmi H: 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:R31.
26. Altman RD: Criteria for the classification of osteoarthritis of the knee and hip. *Scand J Rheumatol Suppl* 1987, 65:31-39.
27. El Mansouri FE, Chabane N, Zayed N, Kapoor M, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Fahmi H: H3K4 methylation by Set1A contributes to IL-1-induced COX-2 and iNOS expression in human OA chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2010, 63:168-179.
28. Zhu X, Lin Y, Bacanamwo M, Chang L, Chai R, Massud I, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Thompson WE, Chen YE: Interleukin-1 beta-induced Id2 gene expression is mediated by Egr-1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2007, 76:141-148.
29. Wierstra I: Sp1: emerging roles-beyond constitutive activation of TATAless housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 372:1-13.
30. Chaudhary LR, Cheng SL, Avioli LV: Induction of early growth response-1 gene by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in normal human bone marrow stromal osteoblastic cells: regulation by a protein kinase C inhibitor. *Mol Cell Biochem* 1996, 156:69-77.
31. Tan L, Peng H, Osaki M, Choy BK, Auron PE, Sandell LJ, Goldring MB: Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2003, 278:17688-17700.
32. Shin SY, Kim JH, Baker A, Lim Y, Lee YH: Transcription factor Egr-1 is essential for maximal matrix metalloproteinase-9 transcription by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cancer Res* 2010, 8:507-519.

33. Rockel JS, Bernier SM, Leask A: Egr-1 inhibits the expression of extracellular matrix genes in chondrocytes by TNFalpha-induced MEK/ ERK signalling. *Arthritis Res Ther* 2009, 11:R8.
34. Khachigian LM, Williams AJ, Collins T: Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995, 270:27679-27686.
35. Zhang P, Tchou-Wong KM, Costa M: Egr-1 mediates hypoxia-inducible transcription of the NDRG1 gene through an overlapping Egr-1/Sp1 binding site in the promoter. *Cancer Res* 2007, 67:9125-9133.
36. Rong Y, Hu F, Huang R, Mackman N, Horowitz JM, Jensen RL, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ: Early growth response gene-1 regulates hypoxiainduced expression of tissue factor in glioblastoma multiforme through hypoxia-inducible factor-1-independent mechanisms. *Cancer Res* 2006, 66:7067-7074.
37. Bahouth SW, Beauchamp MJ, Vu KN: Reciprocal regulation of beta(1)- adrenergic receptor gene transcription by Sp1 and early growth response gene 1: induction of EGR-1 inhibits the expression of the beta (1)-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol* 2002, 61:379-390.
38. Fukada T, Tonks NK: The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2001, 276:25512-25519.
39. Fernandez-Alvarez A, Tur G, Lopez-Rodas G, Casado M: Reciprocal regulation of the human sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1a promoter by Sp1 and EGR-1 transcription factors. *FEBS Lett* 2008, 582:177-184.
40. Davis WJ, Chen ZJ, Ile KE, Tew KD: Reciprocal regulation of expression of the human adenosine 5'-triphosphate binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2) promoter by the early growth response-1 (EGR-1) and Sp-family transcription factors. *Nucleic Acids Res* 2003, 31:1097-1107.
41. Srivastava S, Weitzmann MN, Kimble RB, Rizzo M, Zahner M, Milbrandt J, Ross FP, Pacifici R: Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest* 1998, 102:1850-1859.
42. Zhang F, Lin M, Abidi P, Thiel G, Liu J: Specific interaction of Egr1 and c/EBPbeta leads to the transcriptional activation of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 2003, 278:44246-44254.
43. Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ: Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 1994, 14:1582-1593.

44. Tatarowicz WA, Martin CE, Pekosz AS, Madden SL, Rauscher F Jr, Chiang SY, Beerman TA, Fraser NW: Repression of the HSV-1 latency-associated transcript (LAT) promoter by the early growth response (EGR) proteins: involvement of a binding site immediately downstream of the TATA box. *J Neurovirol* 1997, 3:212-224.
45. Bauge C, Beauchef G, Leclercq S, Kim SJ, Pujol JP, Galera P, Boumediene K: NFkappaB mediates IL-1beta-induced down-regulation of TbetaRII through the modulation of Sp3 expression. *J Cell Mol Med* 2008, 12:1754-1766.
46. Guilherme A, Tesz GJ, Guntur KV, Czech MP: Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-mediated cleavage of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes. *J Biol Chem* 2009, 284:17082-17091.
47. Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ: Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2002, 2:331-341.
48. Wang CC, Sharma G, Draznin B: Early growth response gene-1 expression in vascular smooth muscle cells effects of insulin and oxidant stress. *Am J Hypertens* 2006, 19:366-372.
49. Mostecky J, Showalter BM, Rothman PB: Early growth response-1 regulates lipopolysaccharide-induced suppressor of cytokine signaling-1 transcription. *J Biol Chem* 2005, 280:2596-2605.
50. Cho SJ, Kang MJ, Homer RJ, Kang HR, Zhang X, Lee PJ, Elias JA, Lee CG: Role of early growth response-1 (Egr-1) in interleukin-13-induced inflammation and remodeling. *J Biol Chem* 2006, 281:8161-8168.
51. Decker EL, Nehmann N, Kampen E, Eibel H, Zipfel PF, Skerka C: Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res* 2003, 31:911-921.
52. Prince JM, Ming MJ, Levy RM, Liu S, Pinsky DJ, Vodovotz Y, Billiar TR: Early growth response 1 mediates the systemic and hepatic inflammatory response initiated by hemorrhagic shock. *Shock* 2007, 27:157-164.
53. Fu M, Zhu X, Zhang J, Liang J, Lin Y, Zhao L, Ehrengruber MU, Chen YE: Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 2003, 315:33-41.
54. Virolle T, Adamson ED, Baron V, Birlle D, Mercola D, Mustelin T, de Belle I: The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol* 2001, 3:1124-1128.

55. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzi RM, Ugucioni 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.
56. Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Fassbender HG, Gay S: Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol Int* 1992, 12:53-59.
57. Wang FL, Connor JR, Dodds RA, James IE, Kumar S, Zou C, Lark MW, Gowen M, Nuttall ME: Differential expression of egr-1 in osteoarthritic compared to normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000, 8:161-169.

Figures

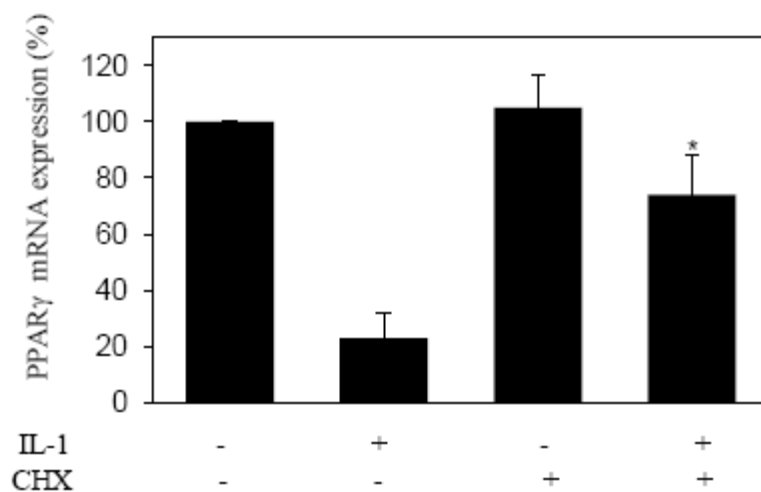


Figure 1: IL-1-mediated downregulation of PPAR γ mRNA expression requires de novo protein synthesis. Chondrocytes were incubated with cycloheximide (10 μ g/mL) for 30 minutes prior to stimulation with 100 pg/mL IL-1 for 18 hours. Total RNA was isolated and was reverse-transcribed into cDNA, and PPAR γ mRNA was quantified by using real-time polymerase chain reaction. Results are expressed as percentage of control (100 is considered the value of untreated cells) and represent the mean \pm standard deviation of four independent experiments. *P < 0.05 compared with cells treated with IL-1 alone. CHX, cycloheximide; IL, interleukin; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

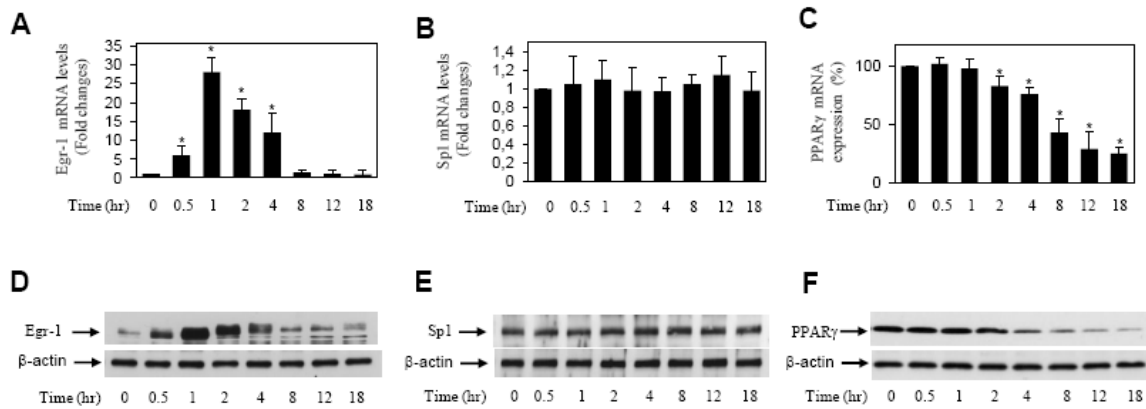


Figure 2: Effect of IL-1 on Egr-1 and Sp1 expression in osteoarthritis chondrocytes.

Chondrocytes were treated with 100 pg/mL IL-1 for the indicated time periods. Total RNA was isolated and was reverse-transcribed into cDNA, and Egr-1 (a), Sp1 (b), and PPARg (c) mRNAs were quantified by using real-time polymerase chain reaction. All experiments were performed in triplicate, and negative controls without template RNA were included in each experiment. (a,b) Results are expressed as fold change, and 1 is considered the value of control (that is, untreated cells). (c) Results are expressed as percentage of control (that is, cells treated with IL-1 alone) and are the mean \pm SD from four independent experiments. The results represent the mean \pm SD of four independent experiments. *P < 0.05 compared with unstimulated cells. Cell lysates were prepared and analyzed for Egr-1 (d), Sp1 (e), and PPARg (f) protein expression by Western blotting. In the lower panels, the blots were stripped and re probed with a specific anti- β -actin antibody. The blots are representative of similar results obtained from four independent experiments. Egr-1, early growth response gene 1; IL, interleukin; PPARg, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; SD, standard deviation; Sp1, specificity protein 1?

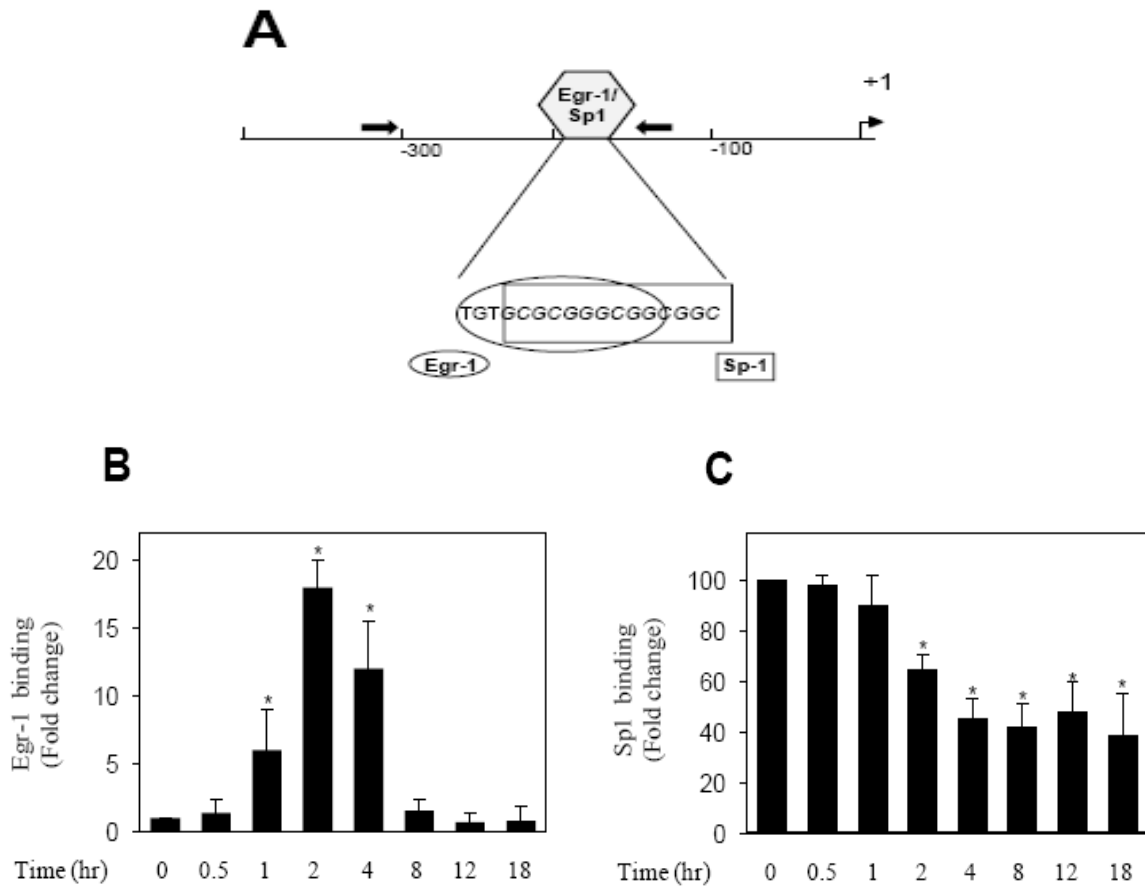


Figure 3 Effect of IL-1 on the recruitment of Egr-1 and Sp1 at the PPAR γ promoter. (a) Schematic diagram of the PPAR γ promoter showing the locations of the overlapping binding site for Egr-1 and Sp1. Arrows indicate primers used for ChIP analysis. (b,c) Confluent chondrocytes were treated with 100 pg/mL IL-1 for the indicated time periods, and ChIP assays were performed by using specific anti-Egr-11 (a) and anti-Sp1 (b) antibodies. (a) The results are expressed as fold change of Egr-1 binding to the PPAR γ promoter relative to untreated cells and represent the mean \pm SD of four independent experiments. (b) Results are expressed as percentage of control (that is, untreated cells) and are the mean \pm SD of four independent experiments. *P < 0.05 compared with unstimulated cells. ChIP, chromatin immunoprecipitation; Egr-1, early growth response gene 1; IL, interleukin; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; SD, standard deviation; Sp1, specificity protein 1.

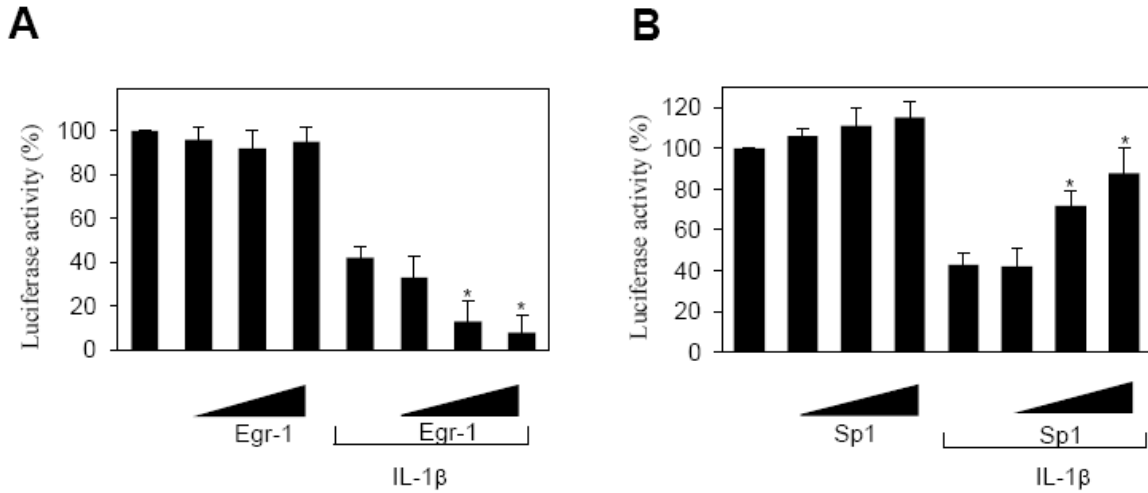


Figure 4: Effect of Sp1 and Egr-1 on PPAR γ promoter activity. Chondrocytes were co-transfected with the human PPAR γ promoter (1 μ g/ well) and the internal control pSV40-b-gal (0.5 μ g/well) together with increasing concentrations of an expression vector for Egr-1 (a) or Sp1 (b). The total amount of transfected DNA was kept constant by addition of the empty vector. The next day, transfected cells were treated with IL-1 (100 pg/mL) for 18 hours. Luciferase activity values were determined and normalized to b-galactosidase activity. Results are expressed as percentage of control (100 is considered the value of untreated cells) and represent the mean \pm SD of four independent experiments. *P < 0.05 compared with cells treated with IL-1 alone (control). Egr-1, early growth response gene 1; IL, interleukin; PPAR γ , peroxisome proliferatoractivated receptor gamma; SD, standard deviation; Sp1, specificity protein 1.

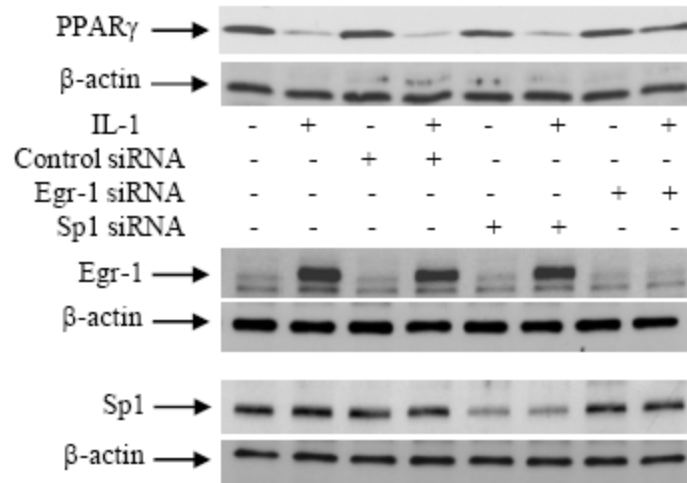


Figure 5: Egr-1 is required for IL-1-mediated suppression of PPAR γ expression. Chondrocytes were transfected with 100 nM of control scrambled siRNA, Sp1 siRNA, or Egr-1 siRNA. At 24 hours after transfection, cells were washed, reincubated for another 24 hours, and left untreated or treated with 100 pg/mL IL-1 for 1 or 18 hours. Cell lysates were prepared and analyzed for Egr-1, Sp1 (1-hour treatment), and PPAR γ (18-hour treatment) protein expression by Western blotting. In the lower panels, the blots were stripped and reprobed with a specific anti- β -actin antibody. The blots are representative of similar results obtained from four independent experiments. Egr-1, early growth response gene 1; IL, interleukin; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; siRNA, small interfering RNA; Sp1, specificity protein 1.

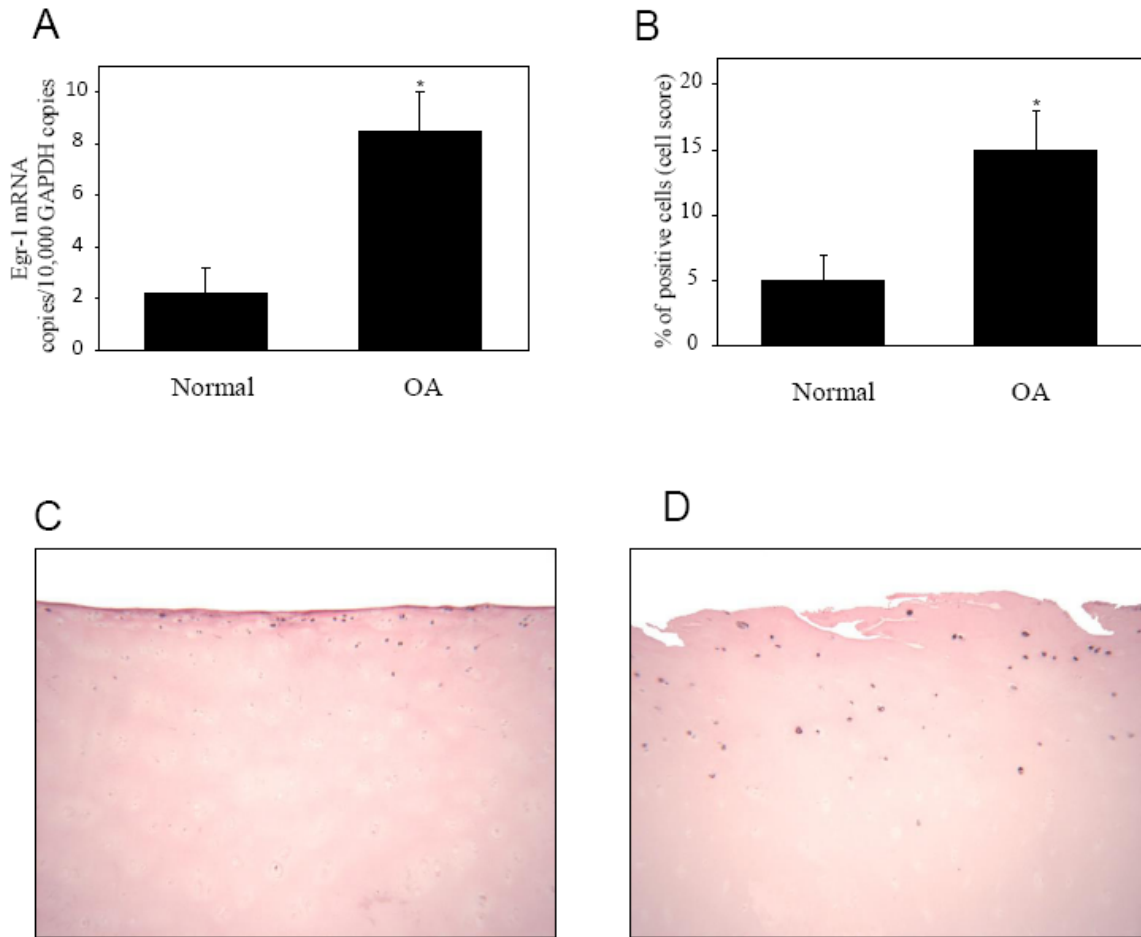


Figure 6: Expression of Egr-1 in normal and OA cartilage. (a) RNA was extracted from normal (n = 9) and OA (n = 9) cartilage, reversetranscribed into cDNA, and processed for real-time polymerase chain reaction. The threshold cycle values were converted to the number of molecules. Data were expressed as copies of the gene's mRNA detected per 10,000 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) copies. *P < 0.05 versus normal samples. (b) Percentage of chondrocytes expressing Egr-1 in normal and OA cartilage. The results are the mean \pm standard deviation of nine normal and nine OA specimens. *P < 0.05 versus normal cartilage. Representative immunostaining of human normal (c) and OA (d) cartilage for Egr-1 protein. Egr-1, early growth response gene 1; OA, osteoarthritis.

Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptors α , β , γ , and H- and L-Prostaglandin D Synthase During Osteoarthritis in the Spontaneous Hartley Guinea Pig and Experimental Dog Models

Sarah-Salwa Nebbaki, Fatima Ezzahra El Mansouri, Hassan Afif, Mohit Kapoor, Mohamed Benderdour, Jean-Pierre Pelletier, Johanne Martel-Pelletier, and Hassan Fahmi*

Author details

S-S. Nebbaki, MSc; F.E. El Mansouri, MSc; H. Afif, PhD; M. Kapoor, PhD; J. Martel-Pelletier, PhD; J-P. Pelletier, MD; H. Fahmi, PhD, Osteoarthritis Research Unit, Research Centre of the University of Montreal Hospital Center (CR-CHUM), Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke Street East, J.A. DeSève Pavillion, Y-2628, and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H2L 4M1, Canada.

M. Benderdour, PhD, Research Centre, Sacré-Coeur Hospital, 5400 Gouin Boulevard West, Montreal, QC H4J 1C5, Canada.

* Direct correspondence to: Hassan Fahmi

Publié dans: J Rheumatol. 2013 Jun. 40(6): p. 877-90. PMID: 23547214.

Abstract

Objective. To investigate the expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α , β , and γ , and hematopoietic and lipocalin-type prostaglandin D synthase (H- and L-PGDS) over the course of osteoarthritis (OA) in the spontaneous Hartley guinea pig and the anterior cruciate ligament transection dog models.

Methods. Guinea pigs were sacrificed at 2 (control group), 4, 8, and 12 months of age (n = 5 per group). Non-operated (control) and operated dogs were sacrificed at 4, 8, and 12 weeks postsurgery. Cartilage was evaluated histologically using the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) guidelines. The expression of PPAR- α , β , γ , and H- and L-PGDS was evaluated by real-time PCR and immunohistochemistry. The nonparametric Spearman test was used for correlation analysis.

Results. PPAR- α , β , and γ were detected in medial tibial plateau from control animals in both the spontaneous and surgical models. Levels of PPAR- α and β did not change over the course of OA, whereas PPAR- γ levels decreased during progression of disease. We also observed that the expression of H-PGDS remained unchanged, whereas L-PGDS increased over the course of OA. PPAR- γ levels correlated negatively, whereas L-PGDS levels correlated positively, with the histological score of OA.

Conclusion. The level of PPAR- γ decreased, whereas level of L-PGDS increased during the progression of OA. These data suggest that reduced expression of PPAR- γ may contribute to the pathogenesis of OA, whereas enhanced expression of L-PGDS may be part of a reparative process.

Key Indexing Terms:

PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS

CARTILAGE

PROSTAGLANDIN D SYNTHASE

OSTEOARTHRITIS

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common form of joint disorder worldwide and is frequently associated with pain and functional impairment. OA is characterized by articular cartilage degradation, synovitis, and subchondral bone remodeling^{1,2,3}. Although the precise etiology of OA is not known, the proinflammatory cytokines such as interleukin 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) are believed to play a pivotal role in pathogenesis^{1,2,3}. One mechanism by which IL-1 exerts its effects is by inducing articular cell tissues to produce several mediators known for their role in articular inflammation and destruction, including matrix metalloproteinases (MMP), aggrecanases, inducible nitric oxide (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), and microsomal prostaglandin E-synthase-1 (mPGES-1)^{1,2,3}.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are ligand-activated transcription factors and members of the nuclear hormone receptor superfamily, which include receptors for steroids, thyroid hormone, vitamin D, and retinoic acid. Three PPAR isoforms have been described: PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ ⁴. PPAR α is mostly present in liver, heart, and muscle, and is believed to function in the catabolism of fatty acid⁵. PPAR β/δ is expressed ubiquitously, and is involved in lipid homeostasis, epidermal maturation, wound healing, and brain development^{6,7}. PPAR γ is the most intensively studied form. It is expressed in a broad range of tissues and plays pivotal roles in various physiological and pathological processes, including the regulation of glucid and lipid metabolism, inflammation⁸, and diabetes⁹. In addition, increasing evidence suggests that PPAR γ plays an important role in the pathogenesis of OA and possibly other chronic arthritic diseases¹⁰.

PPAR γ can be activated by a variety of naturally occurring compounds including the cyclopentanone prostaglandin 15-deoxy- Δ ^{12,14}-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), the most potent endogenous ligand for PPAR- γ to date^{11,12}. Dehydration of PGD₂ generates 15d-PGJ₂. The biosynthesis of PGD₂ is catalyzed by 2 PGD synthases (PGDS): one is glutathione-independent, the lipocalin-type PGDS (L-PGDS), and the other is glutathione-dependent, the hematopoietic PGDS (H-PGDS)¹³.

Several studies have shown that PPAR γ is expressed and functional in cartilage and that PPAR γ agonists downregulate inflammatory responses in chondrocytes. For instance, PPAR γ agonists suppress IL-1-induced iNOS, COX-2, and mPGES-1 expression as well as NO and PGE2 production in human and rat chondrocytes^{14,15,16,17,18,19,20,21}. In addition to their antiinflammatory effects, PPAR- γ activators were also reported to downregulate catabolic responses in articular chondrocytes. Indeed, PPAR γ activators prevent the induction of several MMP including MMP-1, -3, -9, and -13, which play important roles in cartilage degradation^{22,23,24,25}. In support of the protective effects of PPAR γ agonists in OA, we have demonstrated that PPAR γ activators reduce the symptoms and severity of the disease in canine²⁶ and guinea pig²⁷ models.

Although the protective effects of the PPAR- γ pathway in OA have been well documented, little information is available on its expression in cartilage during the course of the disease. We investigated the expression of PPAR- α , β , and γ , and H- and L-PGDS in cartilage during progression of OA in the spontaneous Hartley guinea pig model and anterior cruciate ligament transection (ACLT) dog model.

Materials and methods

Animals

Male Hartley guinea pigs aged 2, 4, 8, and 12 months (n = 5 each) were purchased (Charles River Laboratories). Animals were housed in standard guinea pig cages and fed standard guinea pig chow containing vitamin C (1 mg/g), vitamin D3 (3.4 IU/g), and water *ad libitum*. Animals were acclimated to housing conditions for 1 week prior to experiments. Guinea pigs were euthanized by intraperitoneal injection of barbiturate. Seventeen adult crossbred dogs (age 2 to 3 yrs), each weighing 20 to 25 kg, were used in this study. OA was induced in 12 dogs by surgical sectioning of the ACL of the right knee through a stab incision as described²⁸. The animals were operated on under general anesthesia with phenobarbital sodium (25 mg/kg). After surgery, the dogs were housed on a farm where they could exercise *ad libitum* under supervision to ensure that they were bearing weight on the operated knee. Dogs were sacrificed at 4 weeks (n = 4), 8 weeks (n = 4), or 12 weeks (n = 4) after surgery by intravenous barbiturate overdose injection. Non-operated normal dogs (n = 5) were used as a

baseline control and were subjected to the same housing and exercise conditions. All aspects of this study were approved by the local Institutional Committee for Animal Protection.

Tissue preparation and histological analysis

Guinea pig knee joints were harvested and fixed with TissuFix #2 (Chaptec). Tissues were rinsed with phosphate buffered saline (PBS), decalcified in 5% formic acid for 5 days (2-mo-old animals), 7 days (4-mo-old), 14 days (8-mo-old), and 35 days (12-mo-old). Paraffin sections (5 μ m) of the whole joint (5–10 sections per knee) were stained with Safranin-O and histological grading was performed independently by 2 blinded observers (SSN and FEE) according to the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scoring system²⁹. This scale evaluates the severity of OA lesions based on cartilage structure (scale 0–8), proteoglycan content (scale 0–6), cellularity (scale 0–3), and tidemark integrity (0–1).

The right knee of each dog was placed on ice and dissected. Five specimens of cartilage were removed from fixed predefined locations of the weight-bearing areas of the medial tibial plateaus. Specimens from normal dogs were obtained from the same anatomical sites. Cartilage specimens were fixed in TissuFix #2, embedded in paraffin, and 5 μ m sections prepared. Serial sections (5–10 sections per specimen) were stained with Safranin-O and histological grading was performed independently by 2 blinded observers (SSN and FEE), following OARSI guidelines³⁰. This scale evaluates the severity of OA lesions based on cartilage structure (0–12), cellular changes (0–12), proteoglycan staining (0–12), and collagen integrity (0–9).

Immunohistochemistry

The following antibodies were used: anti-PPAR- α (sc-9000; Santa Cruz Biochemical); anti-PPAR- β (sc7197; Santa Cruz Biochemical); anti-PPAR- γ (sc-7196; Santa Cruz Biochemical); anti-H-PGDS (catalog no. 160013; Cayman Chemical); and anti-L-PGDS (catalog no. 160003; Cayman Chemical).

Five to 10 sections of whole guinea pig knee joints or cartilage samples from weight-bearing areas of the tibial plateau of dogs were processed for immunohistochemistry as described^{26,31}.

Briefly, paraffin sections (5 μm) were deparaffinized in toluene and dehydrated in a graded ethanol series. Specimens were then preincubated with chondroitinase avidin-biotin complex (0.25 U/ml in PBS pH 8.0) for 60 min at 37°C, followed by 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 incubated further for 60 min with 2% normal serum (Vector Laboratories) and overlaid with primary antibody for 18 h at 4°C in a humidified chamber. Each slide was washed 3 times in PBS pH 7.4 and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). The color was developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories) containing hydrogen peroxide and nickel chloride. The slides were counterstained with eosin. The specificity of staining was evaluated using an antibody that had been preadsorbed (1 h, 37°C) with a 20-fold molar excess of the blocking peptide, and by substituting the primary antibody with nonimmune rabbit IgG (Chemicon), at the same concentration as the primary antibody. Evaluation of positive-staining chondrocytes in the central region of the guinea pig joint or cartilage samples from dogs was performed using our method^{26,31}. For each specimen, 6 microscopic fields were examined under 40H magnification. 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).

RNA extraction and reverse transcription-PCR

Cartilage samples were dissected from medial tibial plateaus of guinea pigs or from weight-bearing areas of tibial plateaus of dogs, and total RNA was isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. To remove contaminating DNA, isolated RNA was treated with RNase-free DNase I (Ambion). The RNA was quantitated using the RiboGreen RNA quantitation kit (Molecular Probes), dissolved in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated H₂O, and stored at -80°C until use. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcription (Fermentas) as detailed in the manufacturer's guidelines. One-fiftieth of the reverse transcription reaction was analyzed by real-time PCR as described below.

The following primers were used for guinea pig genes: PPAR- α , sense, 5'-TCA TCA CAG ATA CCC TGT CC-3' and antisense, 5'-CGG TTC TTT TTC TGG ATC TT-3'; PPAR- β , sense, 5'-CTC CAG CAG TTA CAC AGACC-3' and antisense, 5'-GCAGTA- CTG GCA CTT GTT TC-3'; PPAR- γ , sense, 5'-AAG CCG TGC AAG AGA TCACAG- AGT-3' and antisense, 5'-TCT CGT GCA CAC CAT ACT TGA GCA-3'; H-PGDS, sense, 5'-TCA ATA TGA GAG GGA GAG CA-3' and antisense, 5'-AGTCCATCC- ACT TCC AAA AT-3'; L-PGDS, sense, 5'-ATA AGT GCC TGA AGGAGG AG-3' and antisense, 5'-TCT CAG GTC TGC AGT GAA GT-3'; and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), sense, 5'-ACCTGC CGC CTG GAG AA-3' and antisense, 5'-CCC TCT GAT GCC TGCTTC AC-3'; or dog genes: PPAR- α , sense, 5'-AATGCACT-GGAGCTAGATGA-3' and antisense, 5'-GAAGGAGTTTTGGGAAGA GA-3'; PPAR- β , sense, 5'-GCATGAAGCTGGAATATGAG-3' and antisense, 5'-TTT TTCAGGTAG GCGTTGTA-3'; PPAR- γ , sense, 5'-TCACAGAGTACGCCAAAAGT-3' and antisense, 5'-ACTCCCTTGTCATGAATC CT-3'; H-PGDS, sense, 5'-TTTAATATGAGGGGGAGAGC-3' and antisense, 5'-GGC TCTGGGAAGGTTAAGT-3'; L-PGDS, sense, 5'-ACTGCTCTGCTCTTTCCTCT-3' and antisense 5'-GATTTGCT TCCGGAGTTTAT-3'; and GAPDH, sense, 5'-AGGCTGTGGGCAAGGTCATC-3' and antisense, 5'-AAG GTG GAA GAGTGGGTG T-3'.

Real-time PCR

Real-time PCR analysis was performed in a total volume of 50 μ l containing template DNA, 200 nM of sense and antisense primers, 25 μ l of SYBR[®] Green master mix (Qiagen), and uracyl-N-glycosylase (UNG; 0.5 unit; Epicenter Technologies). After incubation at 50°C for 2 min (UNG reaction) and 95°C for 10 min (UNG inactivation and activation of AmpliTaq Gold enzyme), the mixtures were subjected to 40 amplification cycles (15 s at 95°C for denaturation, 1 min for annealing, and extension at 60°C). Incorporation of SYBR[®] Green dye into PCR products was monitored in real time using a GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), allowing determination of the threshold cycle (CT) at which exponential amplification of PCR products begins. After PCR, dissociation curves

were generated with 1 peak, indicating the specificity of the amplification. A CT value was obtained from each amplification curve using the software provided by the manufacturer.

Relative messenger RNA (mRNA) expression in chondrocytes was determined using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method, as detailed in the manufacturer's guidelines (Applied Biosystems). A ΔCT value was first calculated by subtracting the CT value for the housekeeping gene GAPDH from the CT value for the gene of interest. A $\Delta\Delta\text{CT}$ value was then calculated by subtracting the ΔCT value of the control (unstimulated cells) from the ΔCT value of each treatment. Fold changes compared with the control were then determined by raising 2 to the $-\Delta\Delta\text{CT}$ power. Each PCR generated only the expected specific amplicon, as shown by the melting-temperature profiles of the final product and by gel electrophoresis of test PCR. Each PCR was performed in triplicate on 2 separate occasions for each independent experiment.

Human chondrocyte culture

Human OA cartilage was obtained from patients undergoing total knee replacement ($n = 6$, mean age $62 \pm \text{SD } 8$ yrs). All patients with OA were diagnosed on criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA. At the time of surgery, the patients had symptomatic disease requiring medical treatment in the form of nonsteroidal antiinflammatory drugs or selective COX-2 inhibitors. Patients who had received intraarticular steroid injections were excluded. The Clinical Research Ethics Committee of our institution approved the study protocol and informed consent was obtained from each donor. Chondrocytes were released from cartilage by sequential enzymatic digestion as described^{14,25}.

Transient transfection

The expression vector for human L-PGDS was kindly provided by Dr. K. Fujimori (University of Pharmaceutical Sciences, Osaka, Japan)³². Transient transfection experiments were performed using the FuGene-6 transfection reagent according to the manufacturer's recommended protocol (Roche Applied Science). Briefly, chondrocytes were seeded 24 h prior to transfection at a density of 3×10^5 cells/well in 12-well plates and transiently transfected with 1 μg of the parental empty plasmid (pFLAG-CMV-5a) or the L-PGDS

expression plasmid (FLAG-tagged L-PGDS). Eight hours later, the medium was replaced with Dulbecco modified Eagle's medium containing 1% fetal calf serum. At 48 h after transfection, the cells were left untreated or were treated with human recombinant IL-1 (Genzyme) for 24 h. Supernatants were harvested and analyzed for NO and MMP-13 levels. The cells were washed twice in ice-cold PBS and crude extracts were prepared and analyzed by Western blotting with anti-Flag (Sigma) and anti-L-PGDS antibodies as described^{14,25}.

RNA interference

Specific small interfering RNA (siRNA) for PPAR- γ or scrambled control siRNA were obtained from Dharmacon Inc. Chondrocytes were seeded in 6-well plates at 6×10^5 cells/well and incubated 24 h. Cells were transfected with 100 nM siRNA using the HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. The medium was changed 24 h later and cells were incubated an additional 24 h before stimulation with 100 pg/ml IL-1 for 24h. PPAR- γ silencing was evaluated by Western blotting as described^{14,25}.

NO and MMP-13 determinations

Nitrite levels in conditioned media used as an indicator of NO production were determined using the Griess assay as described^{14,25}. Levels of MMP-13 in conditioned media were determined by specific ELISA (R&D Systems). All measurements were performed in duplicate.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS V.13 (SPSS). Data are expressed as the mean \pm SD. Statistical significance was assessed by 2-tailed Student t test. P values < 0.05 were considered statistically significant. The nonparametric Spearman test was used to calculate the correlation between the levels of PPAR- γ and L-PGDS and histological score for OA.

Results

Histological findings

Representative safranin-O-stained sections from 2-, 4-, 8-, and 12-month-old Hartley guinea pig medial tibial plateau articular cartilage are shown in Figure 1A-1D. We focused on this area because it is the site of the earliest OA and reproducible lesions in this model^{33,34,35}. At 2 months of age, the articular cartilage was morphologically normal with a smooth surface (Figure 1A). As guinea pigs became older they developed osteoarthritic lesions. By 4 months of age, the cartilage exhibited minor surface irregularity, with decreased safranin-O staining (Figure 1B). By 8 months, surface erosions were readily detected, both cellularity and safranin-O staining were markedly reduced (Figure 1C), and osteophytes began to develop (results not shown). By 12 months, surface erosion became more severe, accompanied by an increase in proteoglycan loss, osteophyte formation, and subchondral bone sclerosis (Figure 1D).

Representative sections of cartilage from normal nonoperated dogs, and from experimental animals at 4, 8, and 12 weeks postsurgery are shown in Figure 2A-2D. The articular cartilage from normal (non-operated) dogs demonstrated a normal histological appearance (Figure 2A). At 4 weeks postsurgery, histological changes were made evident by loss of surface integrity, hypocellularity, fibrillations, and developing osteophytes (Figure 2B). These changes worsened throughout the course of the disease (Figure 2C, 2D), with the most severe lesions occurring at 12 weeks postsurgery.

Expression of PPAR- α , β , and γ during progression of OA in the spontaneous Hartley guinea pig model.

We performed immunohistochemistry to evaluate the expression of PPAR- α , β , and γ in knee joint cartilage from 2-, 4-, 8-, and 12-month-old guinea pigs. As shown in Figure 1F-1I, PPAR- α was detected in all zones of the articular cartilage, and levels were relatively high in the superficial and middle zones. PPAR- β was located essentially in the superficial and middle zones of the cartilage and was expressed at low levels, compared to PPAR- α (Figure 1K-1N). No significant changes were detected for levels of PPAR- α or PPAR- β at any time

analyzed (Figure 1F-1I and 1K-1N). The specificity of staining was confirmed using antibodies that had been preadsorbed (1 h, 37°C) with a 20-fold molar excess of the immunizing peptides or nonimmune control IgG (data not shown).

In contrast to PPAR- α and β , PPAR- γ expression varied with age and disease progression (Figure 1P-1S). At 2 months of age, the staining was prominent in both superficial and middle zones of the cartilage (Figure 1P). At 4 months of age, there was a decrease in PPAR- γ staining throughout both superficial and middle zones of the cartilage (Figure 1Q). At 8 months of age, PPAR- γ expression was significantly reduced in both the superficial and middle zones compared with cartilage from 4-month-old animals (Figure 1R). In 12-month-old animals, PPAR- γ expression decreased further (Figure 1S). The decrease tended to be more marked in the superficial zone of the cartilage (Figure 1S). Preincubation of the antibody with the immunizing peptide abolished the staining (data not shown).

Next, we performed real-time PCR analyses to determine whether the observed changes at the protein levels were paralleled by changes at the mRNA levels. mRNA gene expression was evaluated as percentage over control (2-month-old animals) after normalization to the internal control gene, GAPDH. Consistent with the changes at the protein levels, the levels of PPAR- α and PPAR- β mRNA did not change during the course of OA, whereas the level of PPAR- γ mRNA decreased during the progression of OA (Figure 3). Hence, the expression level of PPAR- γ in cartilage changed as OA progressed in the Hartley guinea pig model.

Expression of H- and L-PGDS during progression of OA in the spontaneous Hartley guinea pig model.

Next, we analyzed the expression of H- and L-PGDS, which catalyze the biosynthesis of 15d-PGJ₂, the most potent endogenous activator of PPAR- γ . Our results showed both H-PGDS and L-PGDS were present in control cartilage (Figure 4A, 4F). The expression levels of H-PGDS did not change significantly during the course of OA (Figure 4A-4D). In contrast, the levels of L-PGDS varied with age and disease progression (Figure 4F-4I). At 2 months of age, L-PGDS was moderately expressed in the superficial and middle zones (Figure 4A) and increased \sim 2-fold at 4 months of age (Figure 4B). At 8 months of age, L-PGDS levels

continued to increase in both superficial and middle zones of cartilage (Figure 4C). By 12 months of age, the staining was further enhanced compared to that of 8-month-old sections, specifically in the deep zone (Figure 4D). The specificity of the staining was confirmed using antibodies that had been preadsorbed (1 hour, 37°C) with a 20-fold molar excess of the immunizing peptides or nonimmune control IgG (data not shown). Similar to levels of H- and L-PGDS protein, the levels of L-PGDS increased with the progression of OA, whereas levels of H-PGDS remained unchanged (Figure 5).

Expression of PPAR- α , β , and γ during progression of OA in the ACLT dog model.

We investigated the location and expression levels of PPAR- α , β , and γ during the progression of OA in the ACLT dog model. This model mimics joint changes that characterize OA in humans following trauma or injury^{36,37}. Results showed that each PPAR isoform was present in normal cartilage (Figure 2F, 2K, and 2P). PPAR- α was mainly expressed in the superficial and middle zones (Figure 2F-2I) and PPAR- β was detected in all zones of cartilage (Figure 2K-2N). However, the levels of PPAR- α and β did not vary at any time postsurgery (Figure 2F-2I and 2K-2N). Thus, these enzymes were constitutively expressed throughout the time course of OA in this model.

PPAR- γ was expressed mainly in the superficial and middle zones in normal cartilage (Figure 2P) and its levels decreased over the course of OA. At 4 weeks postsurgery, the level of PPAR- γ was lower in both superficial and middle zones of cartilage (Figure 2Q) and decreased further at 8 weeks postsurgery (Figure 2R). By 12 weeks after surgery, the levels of PPAR- γ continued to decrease (Figure 2S). The decrease was more marked in the superficial zones (Figure 2S). In some sections, < 5% of cells were stained and the staining was located only in the middle zone. The immunostaining was abolished by preadsorption of the antibody with the antigenic peptide demonstrating its specificity. Real-time PCR analysis revealed that PPAR- γ mRNA levels decreased, whereas PPAR- α and PPAR- β levels did not change significantly during the course of OA (Figure 6). These findings suggest that the reduction of PPAR- γ expression might be involved in the development of OA.

Expression of H- and L-PGDS during progression of OA in the dog ACLT model.

We also analyzed the expression of H- and L-PGDS in cartilage during the development of OA in the ACLT dog model. Our results showed that both L-PGDS and H-PGDS were detectable in the superficial and middle zones of cartilage from non-operated animals (Figure 7A, 7F).

The expression level of H-PGDS did not vary significantly during the progression of disease (Figure 7A-7D). In contrast, L-PGDS levels increased with disease progression (Figure 7F-7I). In normal cartilage, L-PGDS was detected predominantly in the superficial zone of cartilage and the level was relatively low (Figure 7F). At 4 weeks postsurgery, the levels of L-PGDS were significantly higher than in cartilage from non-operated animals (Figure 7G). At 8 weeks postsurgery, the level of L-PGDS was elevated in all the zones of cartilage (Figure 7H), continued to increase with disease progression, and remained elevated until the end of the study at 12 weeks (Figure 7I). Control sections showed no staining (data not shown). As shown in Figure 8, the pattern of mRNA changes of H- and L-PGDS were similar to those of H- and L-PGDS protein changes. These data suggest that the upregulation of L-PGDS expression might be part of an adaptive mechanism to counterbalance increased inflammatory and catabolic responses.

Correlations between histological score and expression levels of PPAR- γ and L-PGDS.

Correlation analysis was performed to determine whether the levels of PPAR- γ or L-PGDS in cartilage were associated with histological grade of OA in guinea pigs and dogs. As shown in Figure 9, the levels of PPAR- γ correlated negatively ($r = -0.77$, $p < 0.05$; Figure 9A), whereas the levels of L-PGDS correlated positively ($r = 0.66$, $p < 0.05$; Figure 9B) with the histological grade of OA in the spontaneous guinea pig model. There was also a negative correlation between PPAR- γ levels ($r = -0.75$, $p < 0.05$; Figure 9C) and a positive correlation between L-PGDS levels ($r = 0.78$, $p < 0.05$; Figure 9D) and the histological grade of OA in the ACLT dog model.

PPAR- γ silencing enhanced basal and IL-1-induced MMP-13 and NO production in human chondrocytes.

To further define the influence of PPAR- γ downregulation during OA, we investigated the effect of its silencing by siRNA on basal and IL-1 β -induced production of an inflammatory and a catabolic marker of OA, namely NO and MMP-13, respectively. Chondrocytes were transfected with the scrambled control siRNA or PPAR- γ siRNA, and after 48 h of transfection, the cells were left untreated or were stimulated with IL-1 β (100 pg/ml) for 24 h. The levels of MMP-13 protein and nitrites in the conditioned media were determined by ELISA and Griess reagent, respectively. As shown in Figure 10A, transfection with the PPAR- γ siRNA enhanced basal production of both NO and MMP-13 (Figure 10A). Similarly, PPAR- γ silencing enhanced IL-1 β -induced production of MMP-13 and NO production (Figure 9B). In contrast, transfection with scrambled control siRNA had no effect. PPAR- γ protein levels were reduced by as much as 80%–85%, confirming gene silencing (Figure 10, lower panels). These data indicate that PPAR- γ downregulation increased MMP-13 and NO production and confirm its anti-OA properties.

L-PGDS overexpression decreased basal and IL-1-induced MMP-13 and NO production in human chondrocytes.

We also investigated the effect of ectopic expression of L-PGDS on basal and IL-1-induced MMP-13 and NO production in human OA chondrocytes. Chondrocytes were transiently transfected with either an expression vector for human L-PGDS (FLAG-tagged L-PGDS) or the parental empty vector, and at 48 h posttransfection the cells were reincubated in the absence or presence of IL-1 (100 pg/ml) for an additional 24 h, and the levels of nitrites and MMP-13 were measured in conditioned media. As shown in Figure 11, L-PGDS overexpression decreased basal (Figure 11A) and IL-1-induced (Figure 11B) NO and MMP-13 production. Western blotting analysis using anti-FLAG antibody revealed the presence of L-PGDS in FLAG-tagged L-PGDS-transfected cells. In contrast, no signal was detected in nontransfected or empty-vector-transfected cells (Figure 11, lower panels). Moreover, Western blotting with an anti-L-PGDS antibody revealed the presence of L-PGDS in nontransfected and empty-vector-transfected cells and a stronger signal in FLAG-tagged L-

PGDS-transfected cells, confirming gene overexpression (Figure 11, lower panels). As determined by the trypan blue exclusion assay, the viability of the empty-vector-transfected cells was similar to that of L-PGDS-transfected cells, indicating that L-PGDS overexpression did not affect chondrocyte viability (data not shown). These data indicated that L-PGDS overexpression inhibits NO and MMP-13 release in human chondrocytes, further supporting its anti-OA effects in vivo.

Discussion

We investigated the expression of PPAR- α , β , and γ , and H-PGDS and L-PGDS in knee joint cartilage during the progression of OA in the spontaneous Hartley guinea pig model and in the ACLT dog model. We report for the first time, to our knowledge, that expression of PPAR- γ protein decreased, whereas the level of L-PGDS increased during the course of OA in both models. In contrast, the levels of PPAR- α and PPAR- β and H-PGDS did not change. Given the roles of PPAR- γ and L-PGDS, these data suggest that decreased PPAR- γ expression may be involved in the pathogenesis of OA, whereas increased expression of L-PGDS may be part of an attempted reparative process.

Considerable evidence indicates that PPAR- γ has protective properties in OA. Indeed, PPAR- γ activation inhibits the production of several inflammatory and catabolic mediators by chondrocytes and other articular joint cells^{14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25}. In addition, PPAR- γ activators have been tested successfully in animal models of OA^{26,27}. However, the expression pattern of PPAR- γ in cartilage during the course of OA is unknown. Our study demonstrated that normal cartilage from 2-month-old guinea pigs expressed PPAR- α , β , and γ . Expression of PPAR- α was moderate to strong, and was located throughout the 3 zones of cartilage. Expression of PPAR- β and γ was weak to moderate, and was located predominantly in the superficial and middle zones. No changes in PPAR- α or β levels were detected in OA cartilage at any time period studied. By contrast, PPAR- γ levels decreased with age and correlated negatively with the severity of histological damage from 4 to 12 months of age in the Hartley guinea pigs. Similarly, in the ACLT dog model, normal cartilage expressed each PPAR isoform. While the expression of PPAR- α and β remained unchanged, the expression of PPAR- γ decreased with the progression of OA, and was lowest at 12 weeks postsurgery.

The reduced expression of PPAR- γ was not a consequence of reduced cellularity, because the levels of PPAR- α and β did not change with progression of OA. It is noteworthy that the histological changes we observed are consistent with previous findings in both the Hartley guinea pig model^{38,39} and the ACLT dog model^{40,41}. Importantly, the observed reduction in PPAR- γ expression correlated negatively with histological OA scores in both disease models.

These results are consistent with the findings of Dumond, *et al*, who reported reduced PPAR- γ expression in cartilage from a rat model of mono-iodoacetate-induced OA⁴². Similarly, Watters, *et al* described reduced expression of PPAR- γ during progression of OA in the spontaneous STR/Ort mouse model⁴³. Moreover, we have previously demonstrated that the levels of PPAR- γ were reduced in human OA compared to normal cartilage³¹. Hence, considering the antiarthritic properties of PPAR- γ , these data strongly suggest that reduction in PPAR- γ expression may be implicated in the pathogenesis of OA.

Several mechanisms may be involved in the decreased expression of PPAR- γ during OA. The most likely is inflammation. Indeed, we and others have shown that inflammatory mediators known to be elevated in OA joints, such as IL-1, IL-17, TNF- α , and PGE₂, downregulate PPAR- γ expression in several cell types including cultured chondrocytes^{17,31}. Moreover, TNF- α was reported to induce PPAR- γ cleavage through activation of the caspase cascade in adipocytes⁴⁴. A second mechanism that may be responsible for diminished levels of PPAR- γ could be mechanical stress, a known risk factor for knee OA. In this context, reports have shown a negative effect of mechanical and shear stress on PPAR- γ expression^{45,46}. Alternatively, PPAR- γ downregulation could be mediated by hypoxia-inducible factor, which has been shown to have a negative effect on PPAR- γ ⁴⁷, and levels of hypoxia-inducible factor are elevated in OA⁴⁸.

Whereas the expression of PPAR- γ decreased over the progression of OA, levels of PPAR- α and β did not change, suggesting that PPAR- α and β do not play significant roles in the pathogenesis of OA. The role of PPAR- α in OA is controversial. In some studies, PPAR- α activation was shown to prevent IL-1-induced proteoglycan degradation, gelatinolytic activity, and expression of MMP-1, 3 and 13, and to enhance production of IL-1 receptor antagonist⁴⁹. Moreover, PPAR- α activation reduces transforming growth factor- β -induced

proteoglycan synthesis⁵⁰. In contrast, in other studies, activation of PPAR- α had no effect on inflammatory or catabolic responses in chondrocytes such as the IL-1-induced production of NO, MMP-1, and MMP-13¹⁴, IL-1-mediated proteoglycan degradation¹⁷, and lipopolysaccharide- induced expression of the acute-phase protein lipocalin-2/SIP⁵¹. Further studies are clearly warranted to define the role of PPAR- α in the regulation of inflammatory and catabolic responses in chondrocytes and in the pathogenesis of OA.

We investigated the expression of L- and H-PGDS, which catalyze biosynthesis of the endogenous PPAR- γ ligand 15d-PGJ₂. We found that L-PGDS levels increased during the course of OA. In the spontaneous Hartley guinea pig model, the level of L-PGDS was low at age 2 months and had increased significantly at 4 months. Levels increased again from 4 months to 8 months, and remained consistently elevated thereafter to 12 months of age. Similarly, in the ACLT dog model, a significant increase in the level of L-PGDS was observed at Week 4 postsurgery, peaking at Week 8, and then remained at maximal levels by Week 12 postsurgery. These findings are consistent with our previous results showing that the level of L-PGDS was elevated in human OA cartilage compared with normal cartilage⁵². The increased expression of L-PGDS in OA cartilage is likely to be mediated by IL-1 β , because exposure to IL-1 β enhanced L-PGDS expression in human chondrocytes in a time- and dose-dependent manner⁵². Correlation analysis revealed that the increased expression of L-PGDS correlated positively with OA histological score. Given the antiinflammatory and anticatabolic effects of L-PGDS metabolites^{14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27}, it is tempting to speculate that increased expression may be part of a negative feedback control of inflammatory and catabolic responses during OA. It is notable that the observed upregulation of L-PGDS, which catalyzes biosynthesis of the most potent PPAR- γ activator, 15d-PGJ₂, proceeds in parallel with downregulation of PPAR- γ . Thus, it is possible that upregulation of L-PGDS may represent a compensatory mechanism against reduced PPAR- γ expression.

In contrast to L-PGDS, levels of H-PGDS remained unchanged during the progression of OA in both disease models, suggesting that this pathway does not play a significant role in the pathogenesis of OA. However, it is important to highlight that although H-PGDS levels did not change during OA, one cannot exclude the possibility that the enzymatic activity was

modulated, leading to altered levels of 15d-PGJ₂. In this context, one limitation of our study is the lack of data on 15d-PGJ₂ levels in cartilage or synovial fluid. Such quantification may have provided a more sensitive measure of the activity of these enzymes during OA.

It is notable that the increased level of L-PGDS in cartilage was more pronounced and the decreased expression of PPAR- γ was more intense in the ACLT dog model than in the spontaneous guinea pig model. This is likely due to differences in the microenvironments of articular cartilage in the 2 models. Indeed, there are differences in the mechanisms underlying the pathogenesis of naturally occurring and surgically induced OA in guinea pigs^{36,53}, dogs⁵⁴, and mice⁵⁵. For instance, surgically induced OA involves more joint inflammation than spontaneous OA, with elevated levels of the proinflammatory cytokines IL-1 and TNF- α ^{36,53,56}. Interestingly, these 2 cytokines were shown to downregulate PPAR- γ ^{31,44} and to upregulate L-PGDS expression^{52,57}. Mapp, *et al* compared osteochondral and synovial angiogenesis in the spontaneous guinea pig model and the surgical rat model, and found that surgical OA reproducibly displays osteochondral and synovial angiogenesis, whereas the guinea pig model displays low vascularity throughout the course of OA⁵⁸. Thus, it is also possible that increased levels of angiogenic factors in the surgical model may be responsible for the pronounced changes in PPAR- γ and L-PGDS expression. In this context, vascular endothelial growth factor (VEGF) was demonstrated to enhance L-PGDS⁵⁷ and to reduce PPAR- γ expression⁵⁹. Further studies are clearly warranted to define the mechanisms that regulate L-PGDS and PPAR- γ expression in spontaneous and surgically induced OA.

Using human cultured chondrocytes, we demonstrated that PPAR- γ silencing enhanced NO and MMP-13 production, confirming that PPAR- γ has anti-inflammatory and anticatabolic properties and could be protective in OA. This is in agreement with studies from Setoguchi, *et al*⁶⁰ showing that arthritis is exacerbated in mice heterozygous for PPAR- γ deficiency. We also demonstrated that L-PGDS overexpression reduced MMP-13 and NO production in human OA chondrocytes. This is consistent with the findings of Wang, *et al* showing that ectopic expression of L-PGDS in T/C-28a2 chondrocytes inhibits production of IL-6 and activation of nuclear factor- κ B⁶¹. Together with the observed changes in PPAR- γ and L-PGDS levels during the course of OA in the dog and guinea pig models, these findings

suggest that PPAR- γ downregulation may contribute to the pathogenesis of OA, whereas increased expression of L-PGDS may be part of a reparative mechanism.

Our results showed decreased expression of PPAR- γ and increased expression of L-PGDS during the course of OA. Further studies are needed to evaluate whether the reduced expression of PPAR- γ is an underlying cause of OA, whether the upregulation of L-PGDS is a repair response, and whether this applies to humans. Our results also suggest that these pathways may be molecular targets for directed therapy in OA.

Acknowledgements

The authors thank Virginia Wallis for assistance with manuscript preparation.

References

1. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:33-42.
2. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009;11:224.
3. de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: A review. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:1484-99.
4. Abbott BD. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol* 2009;27:246-57.
5. Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha): At the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009;205:1-8.
6. Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:991-8.
7. Hall MG, Quignodon L, Desvergne B. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta in the brain: Facts and hypothesis. *PPAR Res* 2008;2008:780452.
8. Szanto A, Nagy L. The many faces of PPAR-gamma: Anti-inflammatory by any means? *Immunobiology* 2008; 213:789-803.
9. Cho MC, Lee K, Paik SG, Yoon DY. Peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) modulators and metabolic disorders. *PPAR Res* 2008;2008:679137.
10. Fahmi H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Kapoor M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2011;21:1-9.
11. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995;83:813-9.
12. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-12.

13. Urade Y, Eguchi N. Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:375-82.
14. Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1 beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001;44:595-607.
15. Fahmi H, Pelletier JP, 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;10:845-8.
16. Boyault S, Simonin MA, Bianchi A, Compe E, Liagre B, Mainard D, et al. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2, but not troglitazone, modulates IL-1 beta effects in human chondrocytes by inhibiting NF-kappa B and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett* 2001;501:24-30.
17. Bordji K, Grillasca JP, Guze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, et al. Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1-beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem* 2000;275:12243-50.
18. Boyault S, Bianchi A, Moulin D, Morin S, Francois M, Netter P, et al. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-1 beta-induced IKK enzymatic activity and I kappa B alpha degradation in rat chondrocytes through a PPAR gamma-independent pathway. *FEBS Lett* 2004;572:33-40.
19. Li X, Afif H, Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, et al. Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol* 2005;32:887-95.
20. Moulin D, Poleni PE, Kirchmeyer M, Sebillaud S, Koufany M, Netter P, et al. Effect of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma agonists on prostaglandins cascade in joint cells. *Biorheology* 2006;43:561-75.
21. Bianchi A, Moulin D, Sebillaud S, Koufany M, Galteau MM, Netter P, et al. Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1 beta-stimulated rat chondrocytes: Evidence for PPAR gamma-independent inhibition by 15-deoxy-delta^{12,14} prostaglandin J₂. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1325-37.
22. Francois M, Richette P, Tsagris L, Raymondjean M, Fulchignoni-Lataud MC, Forest C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma down-regulates chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element. *J Biol Chem* 2004;279:28411-8.

23. Sabatini M, Bardiot A, Lesur C, Moulharat N, Thomas M, Richard I, et al. Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on proteoglycan degradation and matrix metalloproteinase production in rat cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:673-9.
24. Mix KS, Coon CI, Rosen ED, Suh N, Sporn MB, Brinckerhoff CE. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent repression of collagenase gene expression by 2-cyano-3, 12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid and prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14) J2: A role for Smad signaling. *Mol Pharmacol* 2004;65:309-18.
25. Chabane N, Zayed N, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, et al. Human articular chondrocytes express 15-lipoxygenase-1 and -2: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R44.
26. 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;56:2288-98.
27. Kobayashi T, Notoya K, Naito T, Unno S, Nakamura A, Martel-Pelletier J, et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum* 2005;52:479-87.
28. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998;41:1275-86.
29. Kraus VB, Huebner JL, DeGroot J, Bendele A. The OARSI histopathology initiative — Recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18 Suppl 3:S35-52.
30. Cook JL, Kuroki K, Visco D, Pelletier JP, Schulz L, Lafèber FP. The OARSI histopathology initiative — Recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18 Suppl 3:S66-79.
31. Afif H, Benderdour M, Mfuna-Endam L, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 expression is diminished in human osteoarthritic cartilage and is downregulated by interleukin-1 beta in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R31.
32. Fujimori K, Fukuhara A, Inui T, Allhorn M. Prevention of paraquat-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells by lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J Neurochem* 2012;120:279-91.

33. Bendele AM, Hulman JF. Spontaneous cartilage degeneration in guinea pigs. *Arthritis Rheum* 1988;31:561-5.
34. Bendele AM, White SL, Hulman JF. Osteoarthrosis in guinea pigs: Histopathologic and scanning electron microscopic features. *Lab Anim Sci* 1989;39:115-21.
35. Watson PJ, Carpenter TA, Hall LD, Tyler JA. Cartilage swelling and loss in a spontaneous model of osteoarthritis visualized by magnetic resonance imaging. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4:197-207.
36. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001;1:363-76.
37. Visco DM, Hill MA, Widmer WR, Johnstone B, Myers SL. Experimental osteoarthritis in dogs: A comparison of the Pond-Nuki and medial arthrotomy methods. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:9-22.
38. Johnson K, Svensson CI, Etten DV, Ghosh SS, Murphy AN, Powell HC, et al. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. *Arthritis Rheum* 2004;50:1216-25.
39. Huebner JL, Johnson KA, Kraus VB, Terkeltaub RA. Transglutaminase 2 is a marker of chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis severity in the Hartley guinea pig model of knee OA. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:1056-64.
40. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Altman RD, Ghandur-Mnaymneh L, Howell DS, Woessner JF Jr. Collagenolytic activity and collagen matrix breakdown of the articular cartilage in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1983;26:866-74.
41. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Moldovan F, Jovanovic D, Raynauld JP, et al. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: An immunohistochemical study. *J Rheumatol* 1998;25:1585-94.
42. Dumond H, Presle N, Pottie P, Pacquelet S, Terlain B, Netter P, et al. Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:284-95.
43. Watters JW, Cheng C, Pickarski M, Wesolowski GA, Zhuo Y, Hayami T, et al. Inverse relationship between matrix remodeling and lipid metabolism during osteoarthritis progression in the STR/Ort mouse. *Arthritis Rheum* 2007;56:2999-3009.
44. Guilherme A, Tesz GJ, Guntur KV, Czech MP. Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-mediated cleavage of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes. *J Biol Chem* 2009;284:17082-91.

45. David V, Martin A, Lafage-Proust MH, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, et al. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* 2007;148:2553-62.
46. Ameshima S, Golpon H, Cool CD, Chan D, Vandivier RW, Gardai SJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth. *Circ Res* 2003;92:1162-9.
47. Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: A mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2002;2:331-41.
48. Grimmer C, Pfander D, Swoboda B, Aigner T, Mueller L, Hennig FF, et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha is involved in the prostaglandin metabolism of osteoarthritic cartilage through up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2007;56:4084-94.
49. Francois M, Richette P, Tsagris L, Fitting C, Lemay C, Benallaoua M, et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway potentiates interleukin-1 receptor antagonist production in cytokine-treated chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2006;54:1233-45.
50. Poleni PE, Bianchi A, Etienne S, Koufany M, Sebillaud S, Netter P, et al. Agonists of peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) alpha, beta/delta or gamma reduce transforming growth factor (TGF)-beta-induced proteoglycans' production in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:493-505.
51. Ulivi V, Cancedda R, Cancedda FD. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J(2) inhibits the synthesis of the acute phase protein SIP24 in cartilage: Involvement of COX-2 in resolution of inflammation. *J Cell Physiol* 2008;217:433-41.
52. Zayed N, Li X, Chabane N, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Increased expression of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R146.
53. Wei L, Fleming BC, Sun X, Teeple E, Wu W, Jay GD, et al. Comparison of differential biomarkers of osteoarthritis with and without posttraumatic injury in the Hartley guinea pig model. *J Orthop Res* 2010;28:900-6.
54. Meacock SC, Bodmer JL, Billingham ME. Experimental osteoarthritis in guinea-pigs. *J Exp Pathol* 1990;71:279-93.
55. McNulty MA, Loeser RF, Davey C, Callahan MF, Ferguson CM, Carlson CS. Histopathology of naturally occurring and surgically induced osteoarthritis in mice. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:949-56.

56. Kammermann JR, Kincaid SA, Rumph PF, Baird DK, Visco DM. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in canine osteoarthritis: Immunolocalization of TNF-alpha, stromelysin and TNF receptors in canine osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:23-34.
57. 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.
58. Mapp PI, Avery PS, McWilliams DF, Bowyer J, Day C, Moores S, et al. Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:61-9.
59. Liu Y, Berendsen AD, Jia S, Lotinun S, Baron R, Ferrara N, et al. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest* 2012;122:3101-13.
60. Setoguchi K, Misaki Y, Terauchi Y, Yamauchi T, Kawahata K, Kadowaki T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J Clin Invest* 2001;108:1667-75.
61. Wang P, Zhu F, Tong Z, Konstantopoulos K. Response of chondrocytes to shear stress: Antagonistic effects of the binding partners Toll-like receptor 4 and caveolin-1. *FASEB J* 2011;25:3401-1.

Figures

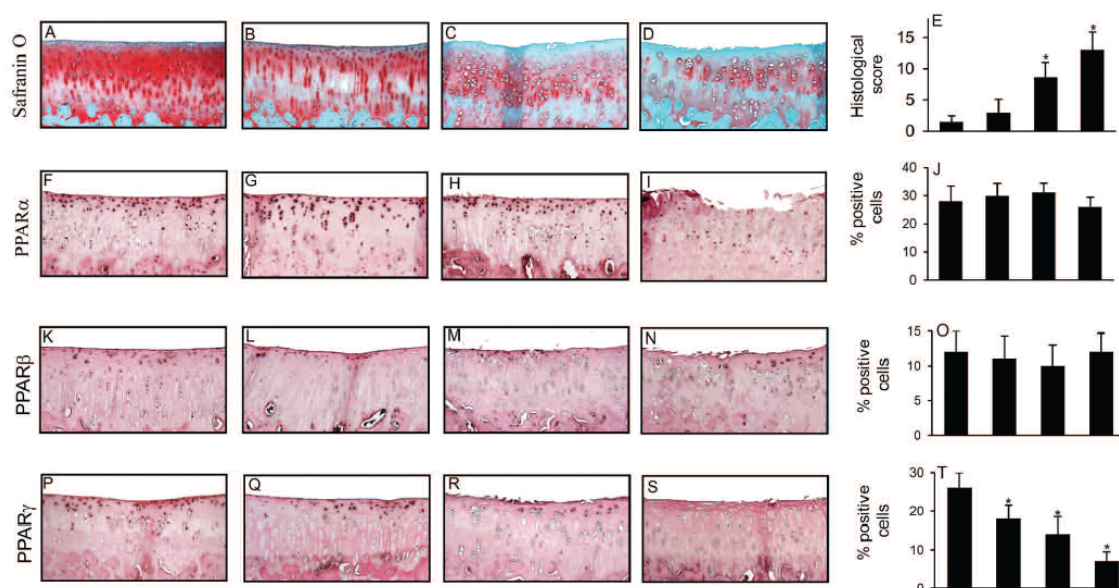


Figure 1. PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ expression during the course of osteoarthritis (OA) in the Hartley guinea pig model. Knee joint sections from 2-, 4-, 8-, and 12-month-old guinea pigs were stained with safranin-O (A, B, C, D) or analyzed by immunohistochemistry for PPAR- α (F, G, H, I), PPAR- β (K, L, M, N), and PPAR- γ (P, Q, R, S). Control for immunostaining included preadsorbing the primary antibodies with a 20-fold molar excess of immunizing antigen, and substituting the primary antibody with nonimmune rabbit IgG (not shown). E. Mean histological score of OA in the medial tibial plateau. J, O, T. Percentage of chondrocytes expressing PPAR- α , β , and γ during progression of OA in the Hartley guinea pig model. Results are mean \pm SD of evaluations of 5 to 10 sections taken from the central region of 5 separate animals. * $p < 0.05$ compared with cartilage from 2-month-old guinea pigs (control). PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors

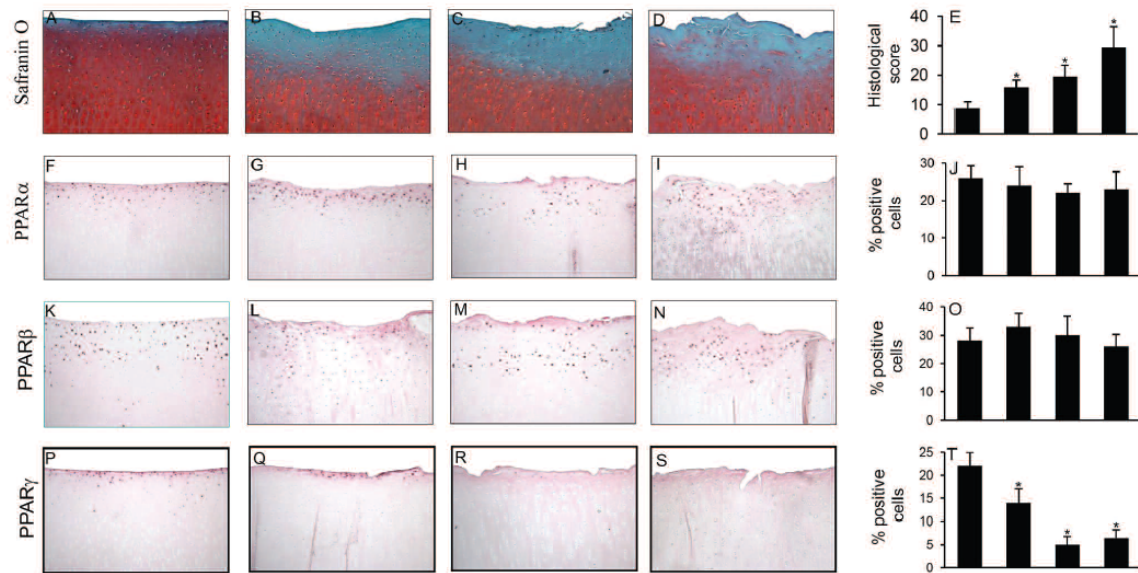


Figure 2. PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ expression in cartilage during the progression of osteoarthritis (OA) in the ACLT dog model. Cartilage sections from weight-bearing areas of tibial plateaus of normal (control) and operated dogs at 4, 8, 10, and 12 weeks postsurgery were stained with safranin-O (A, B, C, D) or analyzed by immunohistochemistry for PPAR- α (F, G, H, I), PPAR- β (K, L, M, N), and PPAR- γ (P, Q, R, S). Control for immunostaining included preadsorbing the primary antibodies with 20-fold molar excess of immunizing antigen, and substituting the primary antibody with nonimmune rabbit IgG (not shown). E. Mean histological score of OA in the medial tibial plateau. J, O, T. Percentage of chondrocytes expressing PPAR- α , β , and γ during progression of OA in the ACLT dog model. Results are mean \pm SD of evaluation of 5 to 10 sections taken from 4 separate animals. * $p < 0.05$ compared with cartilage from non-operated dogs (control). PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors; ACLT: anterior cruciate ligament transection.

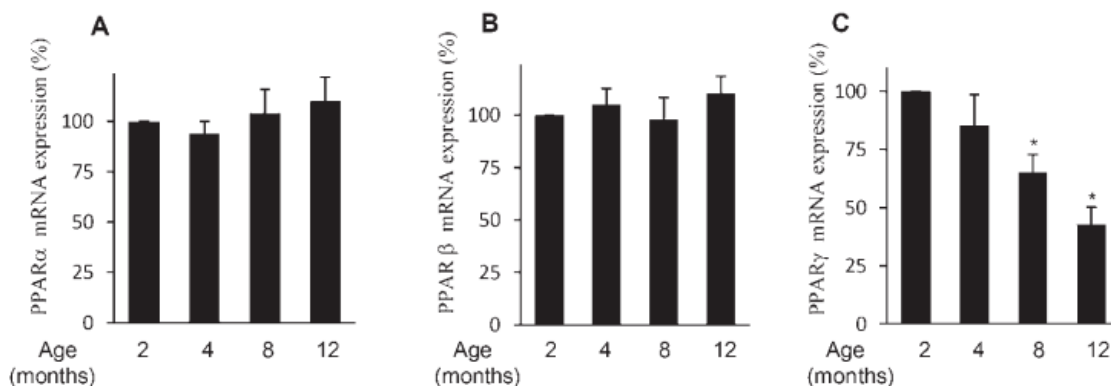


Figure 3. PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ mRNA expression during the course of osteoarthritis (OA) in the Hartley guinea pig model. Cartilage samples were dissected from medial tibial plateaus of 2-, 4-, 8-, and 12-month-old guinea pigs. Total RNA was isolated, reverse transcribed into cDNA, and PPAR- α (A), PPAR- β (B), PPAR- γ (C), and GAPDH mRNA expression was quantified using real-time PCR. All experiments were performed in triplicate and negative controls without template RNA were included in each experiment. Results are expressed as percentage of control (2-mo-old guinea pigs) and are the mean \pm SD from 5 separate animals. * $p < 0.05$ compared with cartilage from 2-month-old guinea pigs (control). PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; mRNA: messenger RNA.

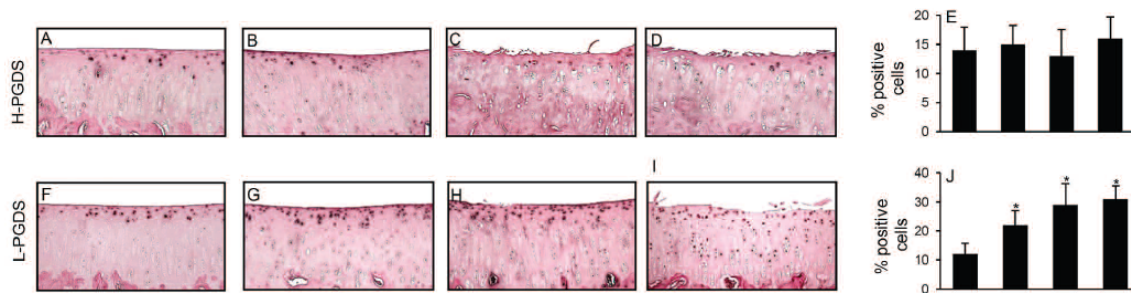


Figure 4. Expression of H-PGDS and L-PGDS during the course of osteoarthritis (OA) in the Hartley guinea pig model. Knee joint sections from 2-, 4-, 8-, and 12-month-old guinea pigs were analyzed by immunohistochemistry for H-PGDS (A, B, C, D) and L-PGDS (F, G, H, I). Control for immunostaining included omitting the primary antibodies, preadsorbing the primary antibodies with a 20-fold molar excess of immunizing antigen, and substituting the primary antibody with nonimmune rabbit IgG (not shown). E, J. Percentage of chondrocytes expressing H-PGDS and L-PGDS during progression of OA in the Hartley guinea pig model. Results are mean \pm SD of evaluation of 5 to 10 sections taken from the central region of 5 separate animals. * $p < 0.05$ compared with cartilage from 2-month-old guinea pigs (control). H-PGDS: hematopoietic prostaglandin D synthase; L-PGDS: lipocalin-type PGDS.

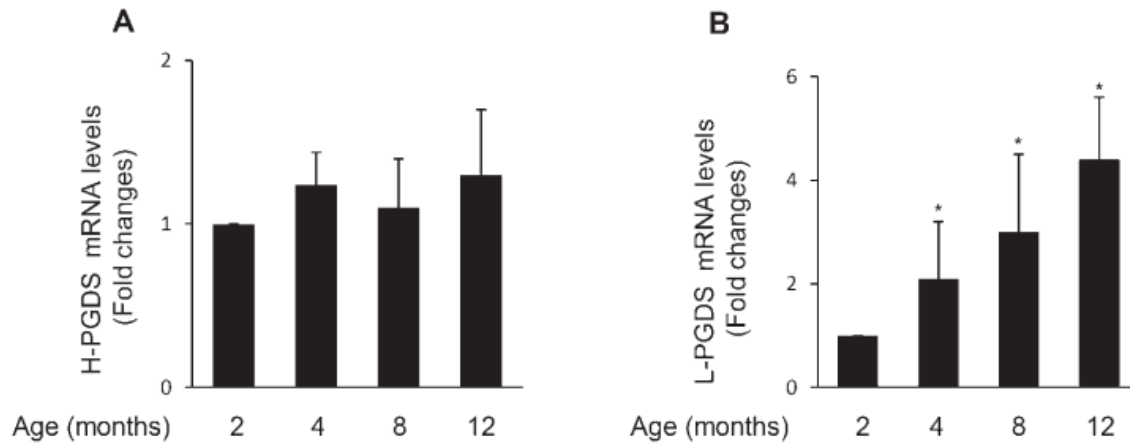


Figure 5. H-PGDS and L-PGDS mRNA expression during the course of OA in the Hartley guinea pig model. Cartilage samples were dissected from medial tibial plateaus of 2-, 4-, 8-, and 12-month-old guinea pigs. Total RNA was isolated, reverse transcribed into cDNA, and H-PGDS (A), L-PGDS (B), and GAPDH mRNA expression was quantified using real-time PCR. All experiments were performed in triplicate and negative controls without template RNA were included in each experiment. Results are expressed as fold change, considering 1 as the value of control (2-mo-old guinea pigs), and are the mean \pm SD from 5 separate animals. * $p < 0.05$ compared with cartilage from 2-month-old guinea pigs (control). H-PGDS: hematopoietic prostaglandin D synthase; L-PGDS: lipocalin-type PGDS; mRNA: messenger RNA; GAPDH: glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase.

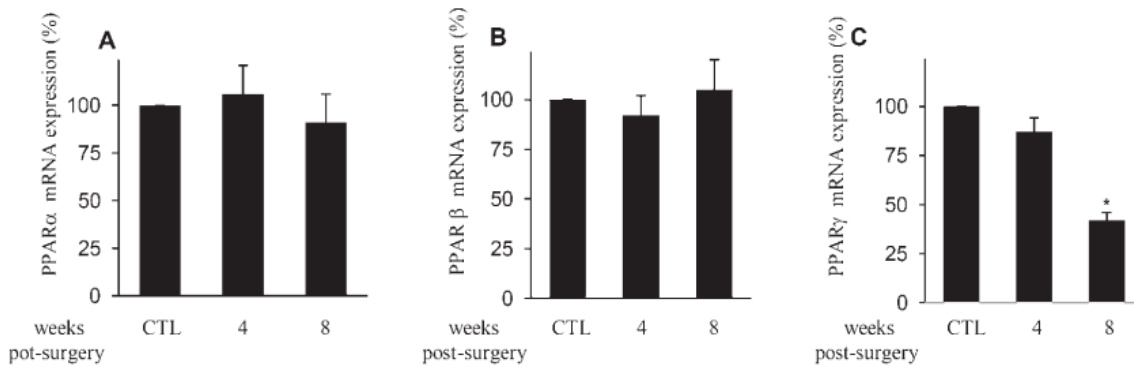


Figure 6. PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ mRNA expression during the course of osteoarthritis in the ACLT dog model. Cartilage samples were dissected from weight-bearing areas of tibial plateaus of normal (control) and operated dogs at 4 and 8 weeks postsurgery. Total RNA was isolated, reverse transcribed into cDNA, and PPAR- α (A), PPAR- β (B), PPAR- γ (C), and GAPDH mRNA expression was quantified using real-time PCR. All experiments were performed in triplicate and negative controls without template RNA were included in each experiment. Results are expressed as fold changes compared to control (non-operated dogs) and are the mean \pm SD from 4 separate animals. * $p < 0.05$ compared with cartilage from non-operated dogs (control). PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors; ACLT: anterior cruciate ligament transection; mRNA: messenger RNA; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

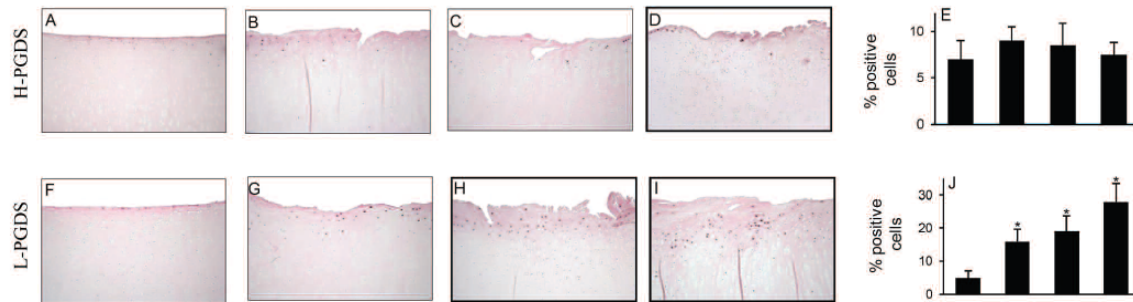


Figure 7. Expression of H-PGDS and L-PGDS in cartilage during the course of osteoarthritis in the ACLT dog model. Cartilage sections from weight-bearing areas of tibial plateaus of normal (control) and operated dogs at 4, 8, 10, and 12 weeks postsurgery were analyzed by immunohistochemistry for H-PGDS (A, B, C, D) and L-PGDS (E, F, G, H). Control for immunostaining included preadsorbing primary antibodies with 20-fold molar excess of immunizing antigen and substituting the primary antibody with nonimmune rabbit IgG (not shown). E, J. Percentage of chondrocytes expressing H-PGDS and L-PGDS during progression of OA in the ACLT dog model. Results are mean \pm SD of evaluation of 5 to 10 sections taken from 4 separate animals. * $p < 0.05$ compared with cartilage from non-operated dogs (control). H-PGDS: hematopoietic prostaglandin D synthase; L-PGDS: lipocalin-type PGDS; ACLT: anterior cruciate ligament transection.

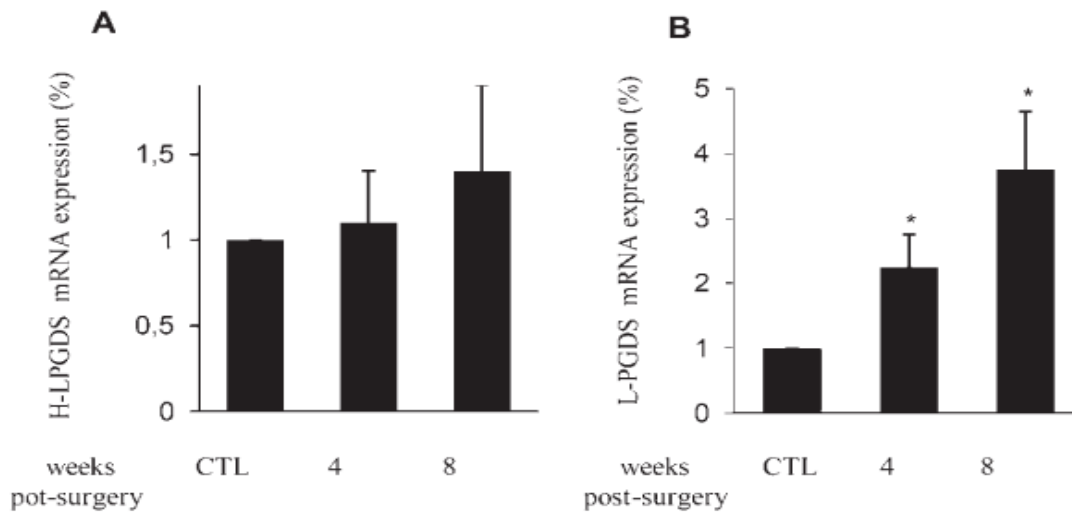


Figure 8. H-PGDS and L-PGDS mRNA expression in cartilage during progression of osteoarthritis in the ACLT dog model. Cartilage samples were dissected from weight-bearing areas of tibial plateaus of normal (control) and operated dogs at 4 and 8 weeks postsurgery. Total RNA was isolated, reverse transcribed into cDNA, and H-PGDS (A), L-PGDS (B), and GAPDH mRNA expression was quantified using real-time PCR. All experiments were performed in triplicate and negative controls without template RNA were included in each experiment. Results are expressed as fold changes compared to control (non-operated dogs) and are mean \pm SD from 4 separate animals. * $p < 0.05$ compared with cartilage from non-operated dogs (control). H-PGDS: hematopoietic prostaglandin D synthase; L-PGDS: lipocalin-type PGDS; ACLT: anterior cruciate ligament transection; mRNA: messenger RNA; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

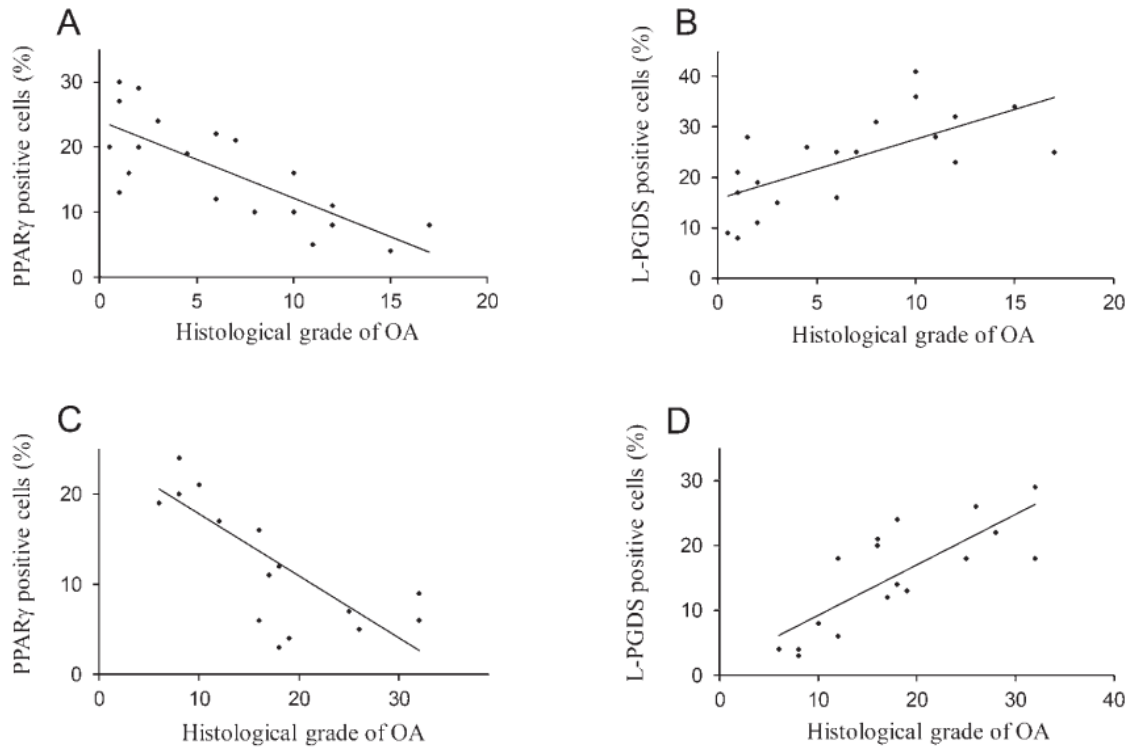


Figure 9. Correlation between levels of PPAR- γ and L-PGDS and histologic grade of osteoarthritis (OA) in the Hartley guinea pig and the ACLT dog model. PPAR- γ levels in cartilage correlated negatively ($r = -0.77$, $p < 0.05$), whereas L-PGDS levels correlated positively ($r = 0.66$, $p < 0.05$) with the histological grade of OA in the Hartley guinea pig model (A, B). There was also a negative correlation between PPAR- γ levels ($r = -0.75$, $p < 0.05$) and a positive correlation between L-PGDS levels ($r = 0.78$, $p < 0.05$) and histological grade of OA in the ACLT dog model (C, D). PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors; L-PGDS: lipocalin-type prostaglandin D synthase; ACLT: anterior cruciate ligament transection.

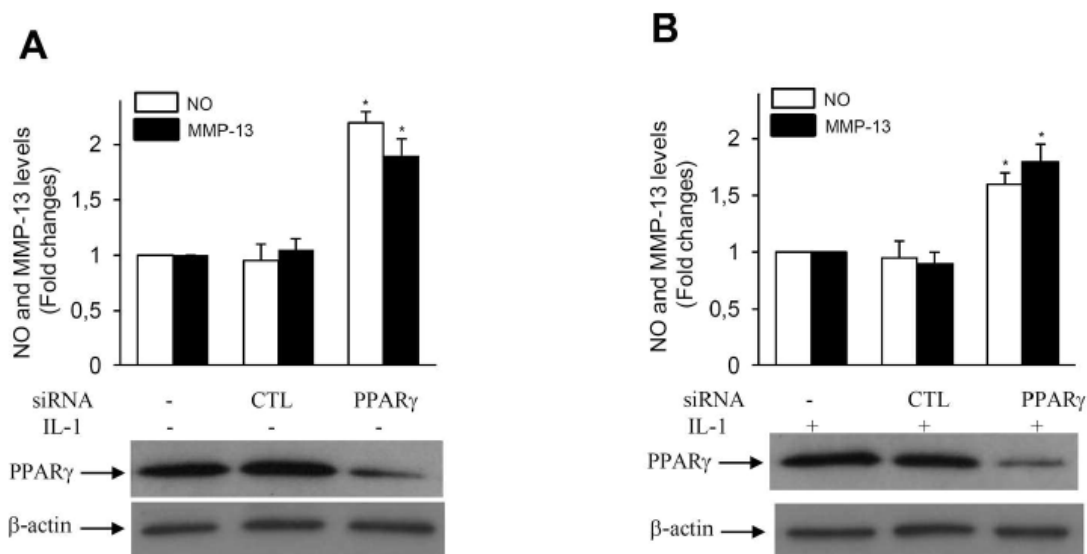


Figure 10. PPAR- γ silencing enhanced basal and IL-1-induced production of NO and MMP-13 in human chondrocytes. Cells were transfected with 100 nM of scrambled control siRNA or PPAR- γ siRNA. At 24 h posttransfection, cells were washed, reincubated another 24 h, and left untreated (A) or treated with 100 pg/ml IL-1 for 24 h (B). Levels of MMP-13 protein and nitrites in the conditioned media were determined by ELISA and Griess reagent, respectively. Results are expressed as fold changes considering 1 as the value of nontransfected cells, and represent mean \pm SD of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ compared with nontransfected cells. Lower panels: cell lysates were prepared and analyzed for PPAR- γ protein expression by Western blotting. Blots were stripped and reprobed with a specific anti- β -actin antibody. Blots are representative of similar results obtained from 4 independent experiments. PPAR: peroxisome proliferator-activated receptors; MMP: matrix metalloproteinases; IL: interleukin; siRNA: small interfering RNA.

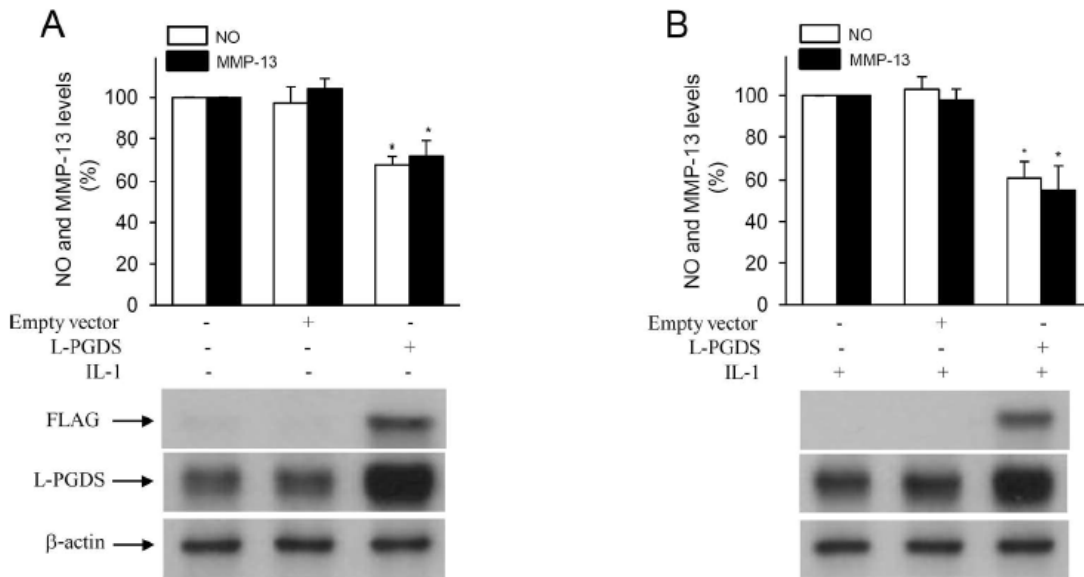


Figure 11. L-PGDS overexpression decreased basal and IL-1-induced production of NO and MMP-13 in human chondrocytes. Cells were transfected with 1 μ g of empty vector or FLAG-tagged L-PGDS. At 8 h posttransfection, cells were washed, reincubated another 40 h, then left untreated (A) or treated with 100 pg/ml IL-1 for 24 h (B). Levels of MMP-13 protein and nitrite/nitrate in the conditioned media were determined by ELISA and Griess reagent, respectively. Results are expressed as percentage of control, considering 100% as the value of nontransfected cells, and represent mean \pm SD of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ compared with non transfected cells. Lower panels: cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting with anti-FLAG, anti-L-PGDS, and anti- β -actin antibodies. Blots are representative of similar results obtained from 4 independent experiments. L-PGDS: lipocalin-type prostaglandin D synthase; IL: interleukin; MMP: matrix metalloproteinases.

CHAPITRE III: DISCUSSION

Le cartilage articulaire est un tissu très important dans la mobilité de nos articulations. L'OA est une maladie dégénérative accompagnée par des changements structuraux et moléculaires au niveau de ce tissu. Les perturbations métaboliques des cellules du cartilage aboutissent à un déséquilibre dans la synthèse de différents médiateurs pro-inflammatoires et cataboliques dans le milieu environnant. L'activation des autres cellules des tissus articulaires accentuent la production de ces médiateurs arthrosiques. Ces derniers, sont à l'origine des évènements destructifs observés au cours de la progression de cette maladie, et peuvent aussi modifier l'expression des gènes ayant un rôle important dans la protection du cartilage articulaire conduisant ainsi à l'altération du fonctionnement normal de l'articulation.

PPAR γ est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Plusieurs données ont montré son rôle protecteur dans l'OA (Fahmi et al., 2011). PPAR γ peut être activé par une variété de ligands naturels dont le plus important est la 15d-PGJ2, un produit de dégradation de la PGD2 (Kliewer et al., 1995; Forman et al., 1995). Comme cité auparavant, la biosynthèse de la PGD2 est assurée par deux types d'enzymes synthases: L-PGDS et H-PGDS (Urade et Eguchi, 2002). L'activation de PPAR γ est à l'origine de l'inhibition de la production de plusieurs médiateurs inflammatoires et cataboliques par les cellules des tissus articulaires (Li et al., 2005; Fahmi et al., 2002; Fahmi et al., 2001). *In vivo*, l'utilisation des agonistes spécifiques a confirmé son rôle dans l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation (Boileau et al., 2007; Kobayashi et al., 2005).

Le rôle protecteur de PPAR γ dans l'OA est bien connu. Dans un travail antérieur de notre laboratoire, nous avons démontré que le cartilage arthrosique présente une faible expression de PPAR γ par rapport au cartilage normal (Afif et al., 2007). Cependant, aucune étude n'a été effectuée pour évaluer le profil d'expression de ce récepteur au cours de la progression de l'OA. À cause de la difficulté d'obtenir des échantillons du cartilage des personnes arthrosiques asymptomatiques, plusieurs recherches ont été effectuées afin de développer des modèles animaux pour suivre l'évolution de cette maladie (Longo et al.,

2012). De ce fait, nous avons porté un intérêt particulier d'une part à l'étude du profil d'expression des trois isoformes de PPAR: PPAR α , PPAR β et PPAR γ ainsi que L-PGDS et H-PGDS dans deux modèles animaux d'OA. D'autre part, à l'identification des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de PPAR γ au niveau des cellules du cartilage articulaire humain.

Le cochon d'inde avec OA spontanée et le chien avec ACLT en font des modèles de choix pour notre étude. Un déséquilibre métabolique des cellules du cartilage articulaire au cours de l'OA se traduit souvent par l'altération de la structure de celui-ci. Donc, nous avons commencé notre étude par l'analyse des changements morphologiques du cartilage durant différents stades de la progression de cette maladie dans les deux modèles animaux.

Pour le cochon d'inde, les analyses histologiques ont montré qu'à l'âge de 2 mois, le cartilage articulaire présente un aspect morphologique normal. Ce modèle développe l'OA au fur et à mesure qu'il vieillit. À 4 mois, une perte de coloration Safanin-O est détectée au niveau de cartilage articulaire, indiquant une altération des protéoglycanes. À 8 mois, des lésions au niveau du cartilage articulaire deviennent visibles, associées à une perte plus prononcée de chondrocytes et des protéoglycanes. À un âge avancé, l'érosion s'étend sur une grande surface du cartilage avec une plus forte déplétion de protéoglycanes, une sclérose de l'os sous-chondral ainsi que la formation des ostéophytes.

Concernant le chien avec ACLT, l'altération de l'intégrité structurale du cartilage, l'hypo cellularité et l'apparition des ostéophytes sont détectés dès les 4 semaines post-chirurgie. Ces changements s'accroissent avec la progression de la maladie et deviennent plus sévères 12 semaines post-chirurgie. Les résultats obtenus concordent avec ceux retrouvés par d'autres chercheurs (Huebner et al., 2009; Johnson et al., 2004; Fernandes et al., 1998; Pelletier et al., 1983).

Le développement de l'OA dans ces deux modèles animaux se rapproche au processus naturel de sa progression chez l'humain. Il est bien connu que la partie médiale est plus affectée que la latérale. En effet, 75 % de la charge et la pression sont transmises au côté médial du genou. Ainsi, le cochon d'inde développe l'OA préférentiellement dans ce côté du

genou, plus spécifiquement dans la région non protégée par le ménisque (Bendele, 2001; Brown et Shaw, 1984). Pour cette raison, nous avons choisi de focaliser nos analyses sur cette région.

L'origine du développement de l'OA spontanée chez le cochon d'inde n'est pas encore bien identifiée. Comme chez l'humain, le poids corporel pourrait être un facteur de risque pour l'apparition de cette pathologie. Dans des études où cette espèce a suivi une diète alimentaire et des exercices, un ralentissement de la maladie a été observé impliquant le facteur mécanique dans le développement de cette pathologie (Bendele et Hulman, 1991; Davis et al., 1989). Aussi, il a été suggéré que des anomalies des ligaments croisés ou l'altération du remodelage osseux pourraient être à l'origine de l'apparition de l'OA dans ce modèle animal (Quasnichka et al., 2006). Dans ce cas, le cochon d'inde semble présenter un modèle d'OA secondaire plutôt que primaire (Little et Smith, 2008). Toutefois, les ressemblances des changements morphologiques et moléculaires du cartilage articulaire avec celle de l'humain au cours de la progression de l'OA, fait de cette espèce animale un modèle de choix pour l'étude de cette pathologie.

Contrairement à ce dernier, le chien avec ACLT est bien connu comme un modèle d'OA secondaire. Les ligaments croisés jouent un rôle important dans la stabilité des genoux. Des blessures au niveau de ces structures pourraient constituer un facteur de risque de cette pathologie (Brandt et al., 2006). Comme pour l'humain, une ACLT chez le chien est à l'origine de l'altération de la distribution des forces et le transfert des charges à l'articulation, ce qui altère la stabilité du genou et provoque l'érosion du cartilage. Cette technique d'induction provoque des changements morphologiques qui se rapprochent à ceux observés chez l'humain en présence d'un traumatisme articulaire (Bendele, 2002; Visco et al., 1996; Marshall et Chan, 1996; Pond et Nuki, 1973). Dans le but d'évaluer l'expression de nos protéines d'intérêt dans différents aspects de développement de l'OA, nous avons choisi le chien avec ACLT comme modèle d'OA secondaire pour notre étude.

Dans ce modèle, la progression de la maladie est influencée par plusieurs paramètres. Bendele et al., ont rapporté que les lésions du cartilage détectées après une ACLT sont plus sévères dans le groupe du chien avec un poids élevé (Bendele, 2001). Aussi, une étude a

montré que l'immobilisation du genou du chien après ACLT ralentit l'apparition de l'OA (Palmski et Brandt, 1982). Un autre paramètre qui pourrait accentuer le développement de l'OA dans ce modèle est la procédure chirurgicale elle-même. En effet, une ACLT est souvent associée à une rupture des vaisseaux voisins. Les saignements intra-articulaires semblent favoriser l'inflammation de la membrane synoviale. Une ACLT en présence d'une cautérisation et une irrigation saline réduit cette inflammation. De même, il s'est avéré que dans ces conditions chirurgicales, les altérations morphologiques du cartilage progressent relativement plus lentement en comparaison avec une ACLT seule. Cela offre l'opportunité d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement de l'OA secondaire en progression lente (Myers et al., 1990).

Comme cité auparavant, les changements histologiques détectés au cours de l'OA sont accompagnés par l'altération de l'expression de plusieurs gènes importants pour la physiologie du cartilage articulaire. L'expression de nos protéines d'intérêt, notamment PPAR α , PPAR β et PPAR γ ainsi que L-PGDS et H-PGDS, a été évaluée dans les deux modèles animaux d'OA.

Notre étude a démontré que PPAR α , PPAR β et PPAR γ sont exprimés dans le cartilage normal du cochon d'inde âgé de 2 mois. L'expression de PPAR α est détectée dans les trois zones du cartilage articulaire avec une intensité modérée à forte. Alors que celle de PPAR γ et PPAR β est moins importante, et est localisée principalement au niveau des zones superficielles et intermédiaires de ce tissu. D'après les analyses faites, aucun changement dans l'expression de PPAR α et PPAR β n'a été détecté durant la période de l'étude. Au contraire, le niveau d'expression de PPAR γ a diminué au fur et à mesure que notre modèle animal prend de l'âge. Concernant le modèle de chien avec ACLT, le cartilage normal exprime aussi les trois isoformes de PPARs. L'expression de PPAR α et PPAR β est restée stable alors que celle de PPAR γ a diminué avec la progression de l'OA. Aussi, pour les deux modèles animaux, nous avons constaté que les variations d'expression protéique sont similaires à ceux observées au niveau de l'ARNm.

En se basant sur les résultats d'histologie et d'immunohistochimie, on peut déduire que la réduction de l'expression de PPAR γ corrèle négativement avec la sévérité des altérations

histologiques du cartilage observées au cours de la progression de la maladie dans les deux modèles animaux. Cette réduction n'est pas liée à la diminution du nombre des cellules dans le cartilage, puisque le niveau d'expression des autres isoformes de PPARs n'a pas changé au cours de la progression de l'OA.

Notre travail est appuyé par les résultats de plusieurs travaux utilisant des modèles animaux différents. Dumond et al., ont rapporté une diminution de l'expression de PPAR γ dans un modèle de rat dont l'OA a été induite par injection du MIA (Dumond et al., 2004). De même, une étude sur le profil d'expression des gènes susceptibles d'avoir un rôle dans la progression de l'OA spontanée chez les souris STR/Ort a montré une diminution de l'expression protéique de PPAR γ dans ce modèle animal (Watters et al., 2007). En plus des résultats obtenus dans notre étude, ces données montrent que la diminution de l'expression de PPAR γ semble contribuer à l'apparition de cette pathologie, probablement en favorisant la production des médiateurs arthrosiques.

Dans ce contexte, nous avons cherché à vérifier cette hypothèse en évaluant l'impact de la diminution de l'expression de ce récepteur dans les cellules du cartilage articulaire humain. Donc, des chondrocytes ont été transfectés par de siRNA PPAR γ en présence ou en absence de l'IL-1 β afin d'analyser le niveau de production de la MMP-13 et le NO, deux médiateurs impliqués dans le développement de cette maladie. Les résultats ont montré que l'utilisation de siRNA PPAR γ favorise l'augmentation de la production de ces médiateurs. En revanche, une faible production de ces médiateurs a été détectée en présence de PPAR γ .

Ces résultats concordent avec plusieurs travaux publiés montrant le rôle anti-inflammatoire et anti-catabolique de ce récepteur. Setoguchi et al., ont rapporté que les souris hétérozygotes en PPAR γ développent une arthrite plus sévère comparativement aux souris contrôles (Setoguchi et al., 2001). De même, l'activation de PPAR γ semble être responsable de l'inhibition de l'expression d'iNOS, la COX-2 et la mPGEs induite par l'IL-1 β ainsi que la production de la PGE2 et le NO par les cellules du tissu articulaire (Li et al., 2005; Fahmi et al., 2002; Fahmi et al., 2001). En plus de son rôle anti-inflammatoire, ce récepteur prévient l'induction de la production des MMPs qui sont des médiateurs cataboliques responsables de la dégradation du cartilage articulaire (Fahmi et al., 2002; Fahmi et al., 2001).

Le rôle anti-arthrosique de PPAR γ a été testé aussi dans d'autres études *in vivo* en utilisant des agonistes spécifiques. Kobayashi et al., ont rapporté que l'activation de ce récepteur réduit la sévérité des lésions du cartilage chez le cochon d'inde avec déstabilisation du ménisque interne. Cette réduction est associée à une diminution de l'expression de la MMP-13 et l'IL-1 β , deux médiateurs ayant un rôle important dans l'apparition de cette pathologie (Kobayashi et al., 2005). Les mêmes résultats ont été rapportés par l'équipe de Boileau et al., en utilisant le modèle de chien avec ACLT. Le traitement de ce modèle animal par un agoniste spécifique de ce récepteur, le pioglitazone, réduit les lésions cartilagineuses. De même, il s'est avéré que l'activation de ce récepteur dans ce modèle animal provoque la réduction de l'expression de différents médiateurs impliqués dans l'OA tels que MMP-1, ADAMTS-5 et iNOS ainsi que l'inhibition de l'activation de la voie des MAP Kinases (ERK-1/2, p38) et NF- κ B (Boileau et al., 2007). En plus des résultats que nous avons obtenus, ces travaux confirment les propriétés protectrices de ce récepteur dans le cartilage articulaire.

Plusieurs médiateurs inflammatoires sont impliqués dans la diminution de l'expression de PPAR γ . Des études ont démontré que les cytokines pro-inflammatoires qui se retrouvent en quantité élevée dans les articulations arthrosiques sont responsables de la répression de l'expression de ce récepteur nucléaire au niveau de différents types cellulaires (Moulin et al., 2006; ; Fahmi et al., 2002; Fahmi et al., 2001; Mbalaviele et al., 2000; Zhang et al., 1996). Par exemple, le TNF- α a été impliqué dans le clivage de PPAR γ via l'activation de la voie des caspases au niveau des adipocytes (Guilherme et al., 2009). Aussi, l'expression de ce récepteur nucléaire semble être affectée en situation de stress mécanique (David et al., 2007). Dans ce contexte, Yun et al., ont rapporté que l'expression de ce récepteur peut être régulée négativement par les facteurs induits par l'hypoxie, dont le niveau est élevé dans le cartilage arthrosique (Yun et al., 2002; Grimmer et al., 2007).

Dans le but de clarifier les mécanismes par lesquels l'expression de PPAR γ pourrait être réprimée dans des conditions arthrosiques, nous avons eu recours à des expériences *in vitro*. Dans un premier temps, nous avons commencé par évaluer l'effet de l'IL-1 β sur l'expression de PPAR γ au niveau des cellules du cartilage articulaire humain. Le traitement des chondrocytes par l'IL-1 β réprime l'expression de PPAR γ confirmant ainsi les résultats

antérieurs de notre laboratoire. Le traitement de ces cellules par la cycloheximide prévient la répression de ce récepteur nucléaire, suggérant que l'effet suppressif de cette cytokine sur l'expression de PPAR γ est indirect et nécessite la synthèse de novo de protéines. L'analyse du promoteur du gène de PPAR γ a permis d'identifier un site de liaison d'Egr-1 qui chevauche avec celui de Sp1.

Le facteur de transcription Sp1 appartient à la famille des facteurs Sp. On retrouve dans cette famille neuf membres: Sp1-9. Les facteurs Sp1, 3, 4 présentent une structure similaire et sont capables de se fixer sur les mêmes sites au niveau du promoteur des gènes. Le facteur de transcription Sp1 est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules. Les gènes cibles de Sp1 présentent au niveau de leurs promoteurs des sites GC capables de lier ce facteur de transcription. Sp1 est souvent décrit comme un activateur de transcription (Wierstra, 2008; Suske, 1999). Il facilite de façon constitutive le recrutement de la machinerie transcriptionnelle basale pour assurer la synthèse de l'ARNm (Emili et al., 1994). De ce fait, la fixation de ce facteur de transcription pourrait induire rapidement l'activation du promoteur en réponse à un stimuli (Ainbinder et al., 2002). Aussi, Sp1 est capable d'interagir avec d'autres facteurs de transcription pour augmenter leur affinité de liaison à l'ADN, et par conséquent l'activité transcriptionnelle du gène cible (Lin et al., 1996; Lee et al., 1993).

Sp1 n'est pas seulement impliqué dans la régulation positive de la transcription des gènes mais aussi dans leur répression. Des études ont rapporté qu'il est capable de se lier via son domaine de liaison à l'ADN à des histones déacétylases (HDAC), des co-répresseurs et des protéines cellulaires qui ne lient pas l'ADN affectant ainsi sa liaison au niveau de promoteur du gène cible, et par conséquent la répression de son activité transcriptionnelle (Wierstra, 2008; Lee et al., 2005; Parakati et DiMario, 2005; Zhang et Dufau, 2002; Murata et al., 1994).

Contrairement au facteur de transcription Sp1, Egr-1 n'est pas exprimé dans les tissus normaux, mais il est rapidement induit par des médiateurs inflammatoires (Tan et al., 2003; Chaudhary et al., 1996). Comme mentionné dans la partie introduction, Egr-1 appartient aux membres des facteurs à réponse précoce (Pagel et al., 2011). Pour les promoteurs qui contiennent des sites de chevauchement Sp1/ Egr-1, Egr-1 peut jouer un rôle activateur ou

répresseur selon le type cellulaire. Par exemple, il a été démontré qu'Egr-1 rentre en concurrence avec Sp1 pour un site de chevauchement au niveau du promoteur de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et active la transcription dans les cellules endothéliales vasculaires (Khachigian et al., 1995). Aussi, Egr-1 est impliqué dans l'induction de la transcription de NDRG1 (gène 1 régulé en aval par N-myc) par les facteurs induits par l'hypoxie (Zhang et al., 2007). En revanche, d'autres études ont indiqué qu'Egr-1 rentre en compétition avec Sp1 et réprime la transcription de certains gènes, y compris le récepteur B adrénergique, la protéine-1 se fixant à l'élément de régulation des stérols, des transporteurs de type ABC, le collagène de type II (Fernández-Alvarez, et al., 2008; Davis et al., 2003; Tan et al., 2003; Bahouth et al., 2002).

Dans notre étude, nous avons montré que le traitement des chondrocytes par l'IL-1 β affecte l'expression d'ARNm et protéique d'Egr-1 de façon temps dépendant. L'expression d'Egr-1 a commencé à augmenter 30 min après stimulation. À partir de 2 h, cette expression a diminué graduellement pour atteindre après 8 h de stimulation son niveau basal (Figure 15). Contrairement à Egr-1, l'expression de Sp1 n'est pas altérée par l'IL-1 β . Tan et al., ont rapporté les mêmes résultats en traitant des chondrocytes de la lignée C-28/I2 par l'IL-1 β (Tan et al., 2003). De même, on a remarqué que l'induction de l'expression d'Egr-1 précède la diminution de celle de PPAR γ , ce qui indique une corrélation entre la surpression de l'expression de PPAR γ et l'induction de celle d'Egr-1 suggérant ainsi un lien entre ces deux événements. Aussi, on a constaté que la répression de l'expression de PPAR γ est progressive dans le temps malgré la diminution de l'expression d'Egr-1. En se basant sur ces données, d'autres facteurs de transcription semblent être impliqués dans l'altération de l'expression de PPAR γ .

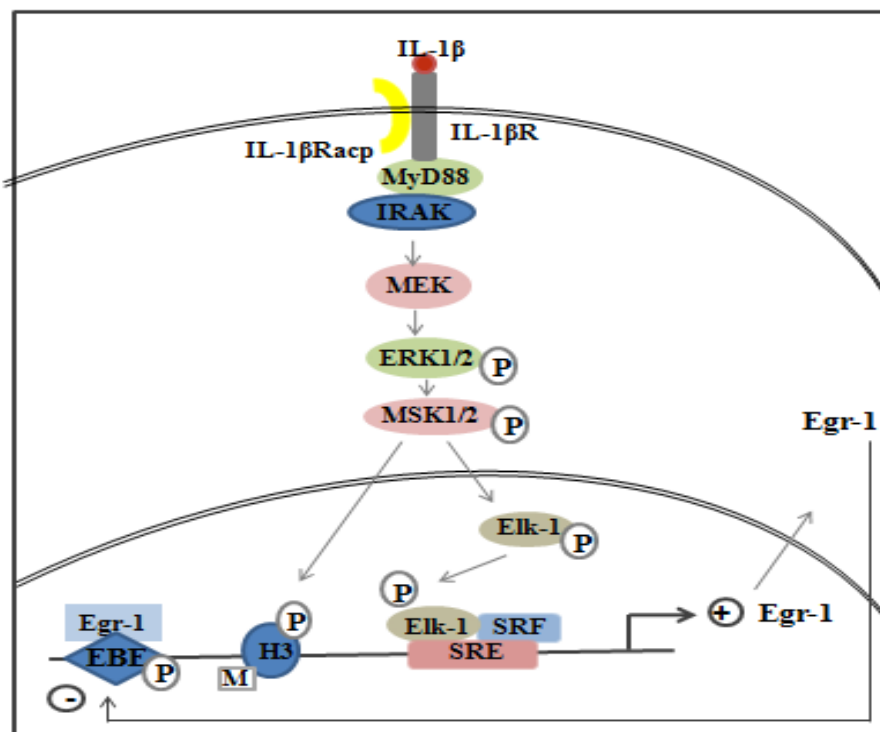


Figure 15: Mécanismes de régulation de l'expression d'Egr-1 par l'IL-1β. La fixation de l'IL-1β sur son récepteur conduit à l'activation de la voie MEK/ERK1/2. ERK1/2 active par la suite MSK1/2. Cette dernière sera responsable de la phosphorylation et l'acétylation des histones au niveau du promoteur Egr-1, et aussi la phosphorylation d'ELK-1 qui se lie sur le complexe SRF/SRE conduisant à son activation. Egr-1 peut se fixer sur son propre promoteur régulant négativement sa propre transcription (Adapté de (Wang et al., 2009)).

L'examen par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP), l'effet de l'IL-1β sur le recrutement d'Egr-1 et Sp1 au niveau du promoteur de PPARγ a démontré que cette cytokine induit le recrutement d'Egr-1 au niveau du promoteur de PPARγ et réduit parallèlement la liaison de Sp1. Ces changements corrént avec la diminution de l'expression de PPARγ. De ce fait, le recrutement d'Egr-1 au niveau du promoteur de PPARγ pourrait être responsable de la diminution de son expression par l'IL-1β.

D'après ces résultats on peut déduire que l'IL-1β accentue l'expression d'Egr-1 et son recrutement au niveau du promoteur PPARγ. En revanche, cette cytokine n'affecte pas l'expression de Sp1 mais réduit sa liaison au niveau du promoteur de PPARγ. De même, il

s'est avéré que la réduction de liaison de Sp1 au niveau de la région promotrice de PPAR γ reste stable dans le temps même en absence d'Egr-1. Ces résultats nous mène à penser qu'il existe des médiateurs induits par l'IL-1 β responsables de l'altération de liaison de Sp1 à PPAR γ , ce qui accentue plus la répression de l'expression de PPAR γ .

Dans ce contexte, des travaux ont révélé que Sp1 est le sujet de plusieurs modifications post-traductionnelles affectant son affinité de liaison à la région promotrice de son gène cible (Wierstra, 2008). Ces modifications sont assurées par plusieurs enzymes dont l'activité est induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α (Guesdon et al., 1994). Par exemple, Armstrong et al., ont rapporté que la phosphorylation de Sp1 par la caséine kinases II au niveau de la thréonine 668 empêche la liaison de Sp1 à l'ADN. Aussi, le traitement des cellules K562 par un inhibiteur de phosphatases augmente la phosphorylation de Sp1 et réduit son affinité de liaison à l'ADN (Armstrong et al., 1997).

En plus de la phosphorylation, l'affinité de liaison de ce facteur de transcription peut aussi être altérée par l'acétylation. D'après Kang et al., Sp1 est capable d'interagir avec des histones désacétylases (HDAC) via son domaine de liaison à l'ADN, ce qui inhibe son affinité de liaison à l'ADN (Kang et al., 2005). En revanche, Chen et al., ont montré que le traitement des cellules A431 dérivées du carcinome épidermoïde humain par un inhibiteur des HDAC, la trichostatin A, inhibe l'expression de la 12(S)-lipoxygénase induite par EGF via l'augmentation de l'acétylation de Sp1 et la réduction de sa liaison au niveau du promoteur du gène cible (Chen et al., 2008). La différence entre ces deux derniers travaux peut être expliquée par l'utilisation de différents types cellulaires. Donc, il semble que ces modifications post-traductionnelles peuvent affecter négativement l'affinité de liaison de Sp1 à l'ADN du gène cible. De ce fait, il serait intéressant d'analyser le mécanisme par lequel ces modifications peuvent diminuer l'affinité de liaison de ce facteur de transcription au niveau du promoteur de PPAR γ dans les chondrocytes humains.

Dans d'autres expériences, nous avons montré que l'IL-1 β réduit l'activité du promoteur de PPAR γ et que cet effet est accentué en présence d'une quantité croissante du vecteur d'expression d'Egr-1. Au contraire, la cotransfection avec une concentration croissante de vecteur d'expression de Sp1 réprime l'effet suppressif de l'IL-1 β favorisant

ainsi l'activité du promoteur de PPAR γ . Ces données corrélient avec les résultats de CHIP et montrent que la diminution de l'expression de PPAR γ induite par l'IL-1 β résulte dans un premier temps d'une compétition entre Egr-1 et Sp1 au niveau du promoteur de PPAR γ qui finit par la fixation d'Egr-1 et la répression de PPAR γ . Donc, la régulation négative et positive du promoteur PPAR γ est médiée par Egr-1 et Sp1, respectivement.

Il est important de noter qu'en absence de l'IL-1 β , la transfection des cellules avec Egr-1 n'a pas d'effet sur l'activité du promoteur de PPAR γ , indiquant que ce facteur de transcription doit être induit pour inhiber l'activité du promoteur de son gène cible. Comme pour Sp1, des études ont montré que l'activité transcriptionnelle d'Egr-1 peut être modulée par phosphorylation grâce à des kinases telles que la caseine kinase II et extracellular signal-regulated kinase (Erk) (Zhang et al., 2003; Srivastava et al., 1998). En effet, Huang et Adamson ont rapporté que la forme phosphorylée d'Egr-1 présente une affinité de liaison élevée à l'ADN comparativement à la forme non phosphorylée (Huang et Adamson, 1994). Aussi, Egr-1 présente des sites pour d'autres modifications post-traductionnelles qui pourraient jouer aussi un rôle dans son activité transcriptionnelle (Yu et al., 2004; Manente et al., 2011).

En plus des modifications post-traductionnelles, des mécanismes d'oxydo-réduction sont capables de cibler la région contenant les doigts de zinc d'Egr-1 en faisant intervenir la protéine Ref1, ce qui affecte son activité de liaison à l'ADN. Selon Huang et Adamson, la forme réduite d'Egr-1 présente une forte capacité de liaison à l'ADN par rapport à la forme oxydée (Huang et Adamson, 1993). D'après ces données, il serait intéressant de vérifier si la suppression de l'expression de PPAR γ par Egr-1 est médiée par l'induction de ce facteur de transcription par l'IL-1 β via l'un de ces mécanismes au niveau des chondrocytes du cartilage articulaire. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'induction d'Egr-1 et son recrutement au niveau du promoteur de PPAR γ est à l'origine de la diminution de l'expression de PPAR γ par l'IL-1 β . Ces résultats sont confirmés par l'utilisation de siRNA Egr-1 qui bloquent l'effet suppressif de cette cytokine.

Après l'activation d'Egr-1 par l'IL-1 β , plusieurs mécanismes pourraient être mis en jeu pour favoriser la fixation de ce facteur de transcription au niveau de son site de liaison à

l'ADN qu'il partage avec Sp1. Egr-1 pourrait réprimer la transcription de PPAR γ en déplaçant par compétition la liaison de Sp1. Des études ont démontré qu'Egr-1 réprime la transcription des gènes qui contiennent des sites de chevauchement pour Egr-1/Sp1 (Tan et al., 2003; Bahouth et al., 2002). Aussi, il est probable que l'activité répressionnelle de ce facteur de transcription soit liée à sa liaison directe à l'ADN sans compétition avec Sp1.

Nous avons démontré dans notre travail une corrélation entre l'augmentation de liaison d'Egr-1 et la diminution de celle de Sp1, et aussi même en présence d'une faible expression et fixation d'Egr-1 au niveau du promoteur de PPAR γ , la faible liaison de Sp1 reste maintenue dans le temps, probablement suite à des modifications post-traductionnelles qui altèrent l'activité transcriptionnelle de ce facteur de transcription (Tan et Khachigian, 2009; Wierstra, 2008). Aussi, des travaux ont rapporté qu'Egr-1 pourrait inhiber l'expression de son gène cible par interaction directe avec Sp1 affectant ainsi son activité transcriptionnelle (Srivastava et al., 1998). De même, il s'est avéré qu'Egr-1 peut bloquer l'interaction entre Sp1 et le complexe TFIID. Ce dernier est responsable du recrutement de l'ARN polymérase au niveau du promoteur du gène cible pour initier sa transcription. Sp1 semble faciliter le recrutement de ce complexe multiprotéique par interaction avec les protéines qu'ils le constituent par exemple, les "TATA binding proteins" (TBP) et des co-facteurs nommés sTAF (TBP associated factor) (Emili et al., 1994; Gill et al., 1994; Tatarowicz et al., 1997). Une autre étude a rapporté qu'Egr-1 pourrait affecter l'activité de Sp1 par compétition avec ses co-activateurs. Il semble qu'Egr-1 réprime la transcription de son gène cible en perturbant l'interaction de Sp1 avec ses co-activateurs CREB (CBP/p300) et TBP (Tan et al., 2003).

Enfin, il est important de noter qu'il est possible que le site de liaison d'Egr-1 et Sp1 au niveau du promoteur de PPAR γ fixe un autre facteur de transcription, Sp3. Comme indiqué auparavant, Sp1 et Sp3 reconnaissent le même site de liaison au niveau de l'ADN et avec la même affinité (Wierstra, 2008; Suske, 1999). Donc, il est possible que Sp3 contribue à la diminution de l'expression de PPAR γ par l'IL-1 β . Aussi, il a été démontré que la répression de l'expression du récepteur TGF- β par l'IL-1 β au niveau des chondrocytes implique l'induction de l'expression de Sp3 qui favorise la répression de Sp1 (Baugé et al., 2008). D'autres études ont démontré que l'activité transcriptionnelle de Sp3 dépend du nombre de

sites de liaison à l'ADN ainsi que du type cellulaire. Ce facteur de transcription joue le rôle d'activateur en présence d'un seul site de liaison au niveau du promoteur du gène cible ou bien du répresseur dans le cas de plusieurs sites (Kubosaki et al., 2009 ; Majello et al., 1997). Il serait intéressant de vérifier l'implication de ce facteur de transcription dans la répression de PPAR γ .

En plus du site de fixation d'Egr-1 et Sp1, le promoteur de PPAR γ comprend des sites de fixation d'autres facteurs de transcription qui pourraient être activés par l'IL-1 β . À titre d'exemple, on retrouve le facteur de transcription AP-1, C/EBP, et autres (Fajas et al., 1993; Lee et Ge, 2014). Bien que le rôle de ces facteurs de transcription dans la diminution de l'expression de PPAR γ par l'IL-1 β n'est pas connu. Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'activation de ces facteurs de transcription par l'IL-1 β pourrait participer à la régulation négative de l'expression de PPAR γ . Cette hypothèse a été appuyée par le fait que l'utilisation de siRNA Egr-1 n'a pas inversé complètement la suppression de PPAR γ induite par l'IL-1 β (Figure 16).

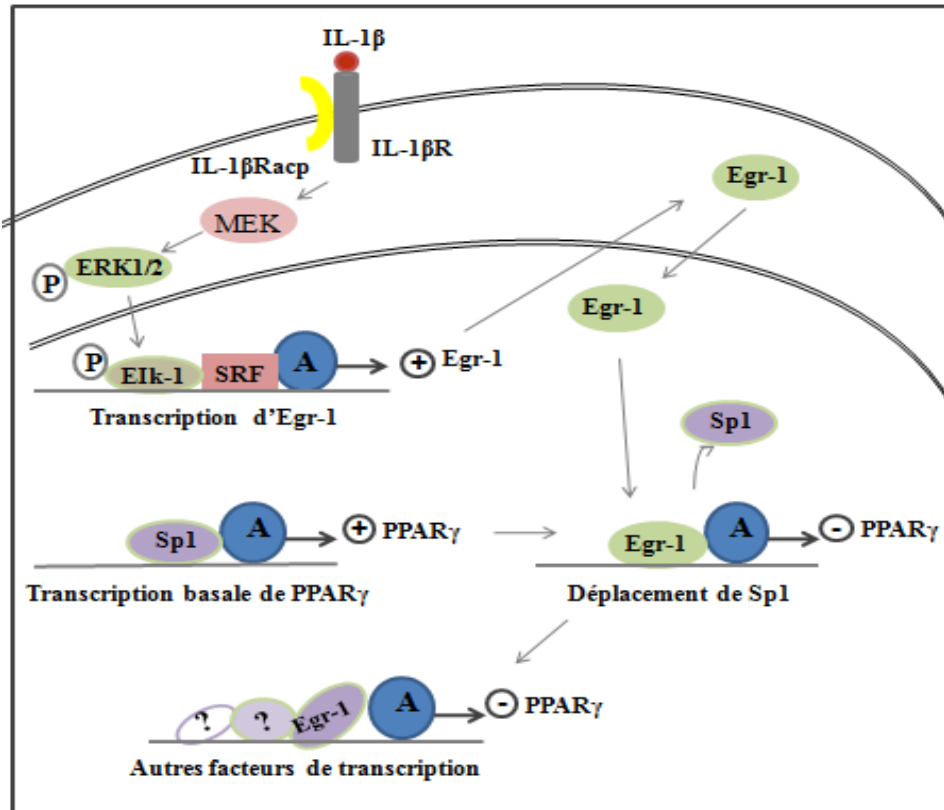


Figure 16: Mécanismes de répression de l'expression de PPAR γ dans le cartilage arthrosique. Le recrutement de l'IL-1 β sur son récepteur est suivi par l'activation de la voie MEK/ ERK1/2. Celle-ci est responsable de la phosphorylation d'ELK-1 qui se lie au complexe SRF/SRE conduisant à son activation et la transcription d'Egr-1. Par la suite, Egr-1 pourrait réprimer la transcription de PPAR γ en déplaçant par compétition Sp1. En plus d'Egr-1, la répression de PPAR γ pourrait être affectée par d'autres facteurs de transcription (?). (A) complexe basale de transcription (Adapté de (Silverman et collins, 1999)).

Plusieurs études ont rapporté le rôle d'Egr-1 dans la régulation positive de l'expression de plusieurs médiateurs inflammatoires et cataboliques impliqués dans la pathologie de l'arthrite. Par exemple, ce facteur de transcription a un rôle important dans l'induction de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-2 (Decker et al., 2003). Il a été également impliqué dans l'activation de la transcription de la mPGEs et la production de la PGE2 au niveau des cellules du tissu articulaire (Cheng et al., 2004). Egr-1 participe à l'induction de la MMP-9 et la suppression du collagène de type II par l'IL-1 β (Shin et al.,

2010; Tan et al., 2003). En plus de nos résultats, ces travaux suggèrent que le contrôle de l'expression d'Egr-1 pourrait avoir un rôle protecteur dans l'OA. Des études *in vivo* seront nécessaires pour clarifier le rôle de ce facteur de transcription dans cette maladie.

Enfin, nous avons analysé l'expression protéique d'Egr-1 au niveau du cartilage humain normal et arthrosique. Nous avons constaté une forte expression de ce facteur de transcription au niveau du cartilage arthrosique comparativement au normal. Cette expression a été localisée principalement dans les couches supérieures du cartilage articulaire. Melchiorri et al., ont rapporté que l'expression de l'IL-1 β est augmentée dans cette région (Melchiorri et al., 1998). Ceci corrèle aussi avec notre travail *in vivo* qui démontre une faible expression de PPAR γ dans la même région du cartilage articulaire des deux modèles animaux utilisés, suggérant ainsi un lien entre les trois médiateurs. Ces résultats sont appuyés par les travaux de Trabandt et al., qui démontrent une forte expression d'Egr-1 dans la membrane synoviale des malades avec AR qui se caractérise par une production élevée des cytokines pro-inflammatoires (Trabandt et al., 1992). Contrairement à notre étude, Wang et al., ont rapporté une faible production d'Egr-1 au niveau du cartilage arthrosique (Wang et al., 2000). Cette variation d'expression pourrait être expliquée par des différences dans les conditions expérimentales. Toutefois, il serait intéressant de vérifier l'implication d'Egr-1 dans la diminution de l'expression de PPAR γ dans les deux modèles d'OA.

Tandis que le niveau d'expression de PPAR γ diminue avec la progression d'OA, celui de PPAR α et PPAR β n'a pas changé dans les deux modèles animaux utilisés, suggérant que PPAR α et PPAR β ne sont pas impliqués dans la pathologie d'OA. Le rôle de PPAR α dans l'OA est encore controversé. Certaines études donnent à penser que ce récepteur possède des propriétés anti-cataboliques et anti-inflammatoires dans l'OA. François et al., ont trouvé que l'activation de PPAR α contrarie l'effet de l'IL-1 β en inhibant la dégradation des protéoglycanes et l'expression de la MMP-1,-3 et -13 via l'augmentation de la production de son récepteur antagoniste IL-1Ra (François et al., 2006). Des effets similaires ont été aussi observés pour la production du NO et la PGE2 (Van Eekeren et al., 2013; Clockaerts et al., 2011). Aussi, il a été observé que l'activation de ce récepteur réduit l'inflammation de la membrane synoviale et la résorption osseuse en stimulant la différenciation des ostéoblastes et

inhibant celle des ostéoclastes (Still et al., 2008; Chan et al., 2007; Akamoto et al., 2005; Mbalaviele et al., 2000). En revanche, d'autres études ont montré des effets opposés. Bordjie et al., ont signalé que l'activation de PPAR α n'a pas d'effets sur la production des médiateurs inflammatoires et cataboliques induite par l'IL-1 β ainsi que sur la diminution de la synthèse des protéoglycanes au niveau des chondrocytes du cartilage articulaire des rats (Bordjie et al., 2000). Les mêmes résultats ont été rapportés dans une étude antérieure de notre laboratoire en utilisant des chondrocytes humains (Fahmi et al., 2001). Dans ce même contexte, Poleni et al., ont montré que l'activation de ce récepteur contrarie l'effet de TGF- β en inhibant la synthèse du collagène, des protéoglycanes ainsi que de TIMPS-1 (Poleni et al., 2010, 2007). D'après l'ensemble de ces données, il est clair que le rôle de ce récepteur dans cette pathologie est difficile à déterminer. De ce fait, d'autres travaux sont nécessaires pour répondre à cette question.

Pour ce qui concerne PPAR β , son rôle dans l'OA n'est pas encore bien établi. L'équipe Moulin et al., a cherché à étudier le rôle de l'activation de PPAR γ et PPAR β dans la correction du déséquilibre de la synthèse de l'IL-1 β et son antagoniste IL-1Ra dans les maladies arthritiques. L'activation de ces récepteurs par des agonistes spécifiques réduit l'expression de l'IL-1 β au niveau des synoviocytes du rat. Aussi, il a été décrit que la stimulation de la production de l'IL-1Ra par l'IL-1 β diminue en présence de la 15d-PGJ2, l'agoniste naturel de PPAR γ , alors qu'elle augmente en présence de l'agoniste de PPAR β , le GW-501516. D'après ces données, PPAR β pourrait avoir un effet anti-arthritique en modulant la production des médiateurs inflammatoires (Moulin et al., 2005). Au niveau de l'os, PPAR β semble jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie du tissu osseux. L'activation de ce récepteur augmente le nombre des ostéoblastes, inhibe la différenciation des ostéoclastes et donc la résorption osseuse. Le rôle thérapeutique de ce récepteur a été testé *in vivo* chez des souris ayant subi une ovariectomie. Le traitement de ces souris avec un agoniste spécifique de ce récepteur corrige la perte osseuse survenue suite au déséquilibre hormonal associé à l'ablation ovarienne (Scholtysek et al., 2013; Mbalaviele et al., 2000).

D'après ces résultats, on peut déduire que parmi les trois isoformes de PPARs, PPAR γ semble le plus impliqué dans la pathologie d'OA. De ce fait, nous avons porté un intérêt

particulier à l'étude de l'expression de la L-PGDS et la H-PGDS au cours de la progression de cette maladie. Ces enzymes sont responsables de la synthèse du ligand endogène de ce récepteur, la 15d-PGJ2. Nous avons constaté que les deux enzymes sont exprimées dans le cartilage normal des deux modèles animaux.

Le niveau d'expression d'ARNm et protéique de la L-PGDS augmente au cours de la progression de l'OA. Dans le modèle du cochon d'inde, le niveau de cette enzyme était faible à l'âge de 2 mois et a augmenté significativement à 4 mois. À l'âge de 8 mois, l'expression de cette enzyme continue d'augmenter dans les zones superficielles et intermédiaires du cartilage articulaire. À 12 mois, son expression s'accroît principalement dans les zones profondes de ce tissu.

De même, le niveau d'expression de la L-PGDS était plus significatif pendant les 4 semaines post-chirurgie dans le modèle du chien avec ACLT comparativement au contrôle. Il devient plus important 8 semaines post-chirurgie et continue d'augmenter au cours de la progression de l'OA. Ensuite, il reste élevé jusqu'à 12 semaines post-chirurgie. Ces résultats appuient des données antérieures de notre laboratoire, qui ont montré que le niveau d'expression de la L-PGDs est plus important dans le cartilage arthrosique humain par rapport au normal.

Il est bien connu qu'au cours de l'OA, on retrouve une forte production des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β . L'expression élevée de la L-PGDS dans le cartilage arthrosique semble être médiée par cette cytokine. En effet, on a déjà démontré que le traitement des chondrocytes par l'IL-1 β induit une augmentation de l'expression de cette enzyme de manière dose et temps dépendants. Cet effet est lié à l'activation des différentes voies de signalisations ciblées par cette cytokine comme les MAP Kinases (JNK, p38 kinase) ainsi que la voie NF- κ B (Zayed et al., 2008). Ces résultats ont été confirmés par d'autres travaux utilisant différents types cellulaires comme les macrophages, les cellules endothéliales et les leptoméniges (Joo et al., 2007; Miyagi et al., 2005; Fujimori et al., 2003). L'analyse de la région promotrice de cette enzyme a montré la présence des sites de fixation des facteurs de transcription induits par ces voies de signalisation tels que AP-1 et NF- κ B (Miyagi et al., 2005; Fujimori et al., 2003). Ces derniers pourraient être responsables de l'induction de la L-

PGDS par cette cytokine dans l'OA chez les deux modèles animaux. Donc, il serait intéressant de vérifier l'implication de ces facteurs de transcription dans l'activation de cette enzyme au niveau des cellules du cartilage articulaire.

Dans notre étude, l'expression de la L-PGDS corrèle positivement avec les changements histologiques observés au cours de la progression de cette maladie dans les deux modèles animaux. Compte tenu des propriétés anti-inflammatoires et anti-cataboliques des métabolites de la L-PGDS, il semble que celle-ci exerce une boucle de contrôle négative sur les effets arthrosiques induits par l'IL-1 β (Li et al., 2005; Fahmi et al., 2002; Fahmi et al., 2001). Pour confirmer cette hypothèse, nous avons cherché à analyser l'effet de la surexpression de cette enzyme sur la production basale et induite de la MMP-13 et le NO par l'IL-1 β . D'après les résultats obtenus, la surexpression de la L-PGDS est associée à l'inhibition de la production de ces médiateurs arthrosiques, ce qui confirme son rôle protecteur dans cette maladie. Il est possible que l'augmentation de l'expression de cette enzyme au cours de l'OA présente un mécanisme compensateur quant à la réduction de l'expression de PPAR γ .

En effet, des études ont rapporté que la 15d-PGJ2, le métabolite le plus impliqué dans les propriétés anti-inflammatoires et anti-cataboliques de PPAR γ au niveau des chondrocytes est capable d'exercer les mêmes effets indépendamment de ce dernier. Nous avons déjà démontré que la 15d-PGJ2 est capable de réduire l'activité du promoteur de la MMP-13 et d'iNOS dans des cellules HeLa, qui normalement n'expriment pas PPAR γ (Fahmi et al., 2001; Ricote et al., 1998). L'analyse de la région promotrice des gènes de ces deux médiateurs a révélé que leur activation pourrait être médiée par la fixation des facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1 dans des conditions inflammatoires (Li et al., 2005; Tardif et al., 1997).

Pour NF- κ B, des études ont rapporté que la 15d-PGJ2 est capable d'inhiber directement l'expression des gènes induits par ce facteur de transcription. Dans les conditions normales, le NF- κ B est bloqué par IKKB (kinase de la famille d'IKK) dans le cytoplasme. La stimulation des cellules par des médiateurs inflammatoires conduit à la phosphorylation de la sous unité IKKB et sa dégradation. Par la suite, NF- κ B est libéré et transloqué dans le noyau provoquant

l'activation de ses gènes cibles. La 15d-PGJ2 semble bloquer l'activation des effets médiés par ce facteur de transcription en empêchant d'une part la phosphorylation de la sous unité IKKB et d'autre part en inhibant la liaison de ce facteur de transcription sur l'ADN du gène cible (Rossi et al., 2000; Straus et al., 2000).

Contrairement à NF- κ B, l'effet de 15d-PGJ2 sur AP-1 est controversé, nous avons déjà démontré que ce métabolite pourrait diminuer l'activité de ce facteur de transcription induite par MEKK1 (Fahmi et al., 2001). En revanche Straus et al., ont rapporté que la 15d-PGJ2 est capable de potentialiser l'induction de ce facteur de transcription par TPA, probablement via la stimulation des voies de signalisation (JNK/SAPK et p38 MAPK), qui sont à l'origine de l'activation et la fixation sur l'ADN des protéines qui constituent le facteur de transcription AP-1 (Straus et al., 2000).

D'après l'ensemble de ces travaux, l'augmentation de l'expression de la L-PGDS peut faire partie de l'un des mécanismes de tentative de réparation au cours de la progression de cette pathologie. Toutefois, les effets anti-arthrosiques médiés par la L-PGDS ne sont pas suffisants pour stopper la progression de cette maladie dans les deux modèles animaux utilisés de notre étude, malgré sa forte expression dans le cartilage arthrosique. Ceci nous mène à déduire que les effets des médiateurs inflammatoires et cataboliques activés dans les conditions arthrosiques l'emportent sur les effets anti-arthrosiques de cette enzyme.

Contrairement à la L-PGDS, le niveau d'expression de la H-PGDS est resté stable au cours de la progression de l'OA dans le cartilage articulaire des deux modèles animaux utilisés, ce qui nous laisse suggérer que cette voie ne joue pas un rôle important dans la pathogène de l'OA. En se basant sur ces résultats, il est important de souligner que même si le niveau d'expression de la H-PGDS n'a pas changé au cours de l'OA, on ne peut exclure la possibilité que l'activité enzymatique de cette enzyme soit modifiée, conduisant ainsi à l'altération du niveau de la 15d-PGJ2. Dans ce contexte, il serait important de mesurer l'activité de cette enzyme dans l'articulation au cours de cette maladie.

Dans cette même étude, nous avons noté que le niveau d'expression de la L-PGDS est plus prononcé et celui de PPAR γ est plus faible dans le modèle ACLT comparativement au

modèle spontané. Cela est probablement dû à des différences dans le micro environnement du cartilage articulaire des deux modèles animaux. Des études ont rapporté qu'il existe une différence dans les mécanismes impliqués dans le développement de cette maladie de façon naturelle et induite chirurgicalement dans différents modèles animaux (McNulty et al., 2012; Wei et al., 2010; Bendele et al., 2001). En effet, l'OA induite chirurgicalement est caractérisée par une érosion du cartilage plus importante comparativement avec l'OA spontanée, et ceci est associé à la production des niveaux élevés des médiateurs arthrosiques tels que les cytokines pro- inflammatoires l'IL-1 β et le TNF- α (Wei et al., 2010; Kammermann et al., 1996). D'autres études ont montré que ces deux cytokines sont capables de réduire l'expression de PPAR γ et d'augmenter celle de la L-PGDS (Zayed et al., 2008; Afif et al., 2007; Guilherme et al., 2009; Gallant et al., 2005).

De même, la comparaison de la vascularisation de la jonction ostéochondrale et la membrane synoviale entre le modèle d'OA spontanée, le cochon d'inde et le modèle d'OA induite, le rat avec rupture du ménisque interne a révélé une forte angiognèse dans le cas d'OA induite comparativement au modèle d'OA spontanée (Mapp et al., 2008). D'après ces résultats, il est possible que l'augmentation de la production des facteurs angiogéniques dans le modèle chirurgical puisse être responsable des changements d'expression de PPAR- γ et la L-PGDS observés au cours de la progression de cette maladie. En effet, il s'est avéré que le VEGF est impliqué dans la diminution de l'expression de PPAR γ et l'augmentation de celle de la L-PGDS (Liu et al., 2012; Gallant et al., 2005). D'autres travaux sont nécessaires pour étudier le rôle de VEGF dans la régulation de l'expression de PPAR γ et la L-PGDS au niveau du cartilage articulaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus de nos travaux ont démontré le rôle d'Egr-1 dans l'altération de l'expression de PPAR γ par l'IL-1 β au niveau des chondrocytes articulaires humains. Aussi, ils ont indiqué pour la première fois le profil d'expression des trois isoformes de PPARs: PPAR α , PPAR β et PPAR γ ainsi que H-PGDS et L-PGDS durant le développement de l'OA chez deux modèles animaux de cette maladie: le cochon d'inde avec OA spontanée et le chien avec OA induite par ACLT.

Dans la première partie de notre étude nous avons démontré que l'IL-1 β réduit l'expression de PPAR γ via l'induction précoce d'Egr-1. La répression de l'expression de PPAR γ est maintenue dans le temps malgré la diminution de l'expression d'Egr-1. De même, l'utilisation de siRNA Egr-1 n'a pas inversé en totalité la répression de l'expression de PPAR γ induite par l'IL-1 β . Afin de comprendre le mécanisme responsable de cette répression continue, il serait intéressant d'analyser le promoteur de PPAR γ pour prédire les sites de fixation d'autres facteurs de transcription qui pourraient être activés par l'IL-1 β au niveau des chondrocytes du cartilage articulaire.

Nous avons également rapporté que l'IL-1 β favorise le recrutement d'Egr-1 au niveau du promoteur de PPAR γ et réduit parallèlement la liaison de Sp1. Le mécanisme par lequel cet effet est produit reste encore inconnu. On pourrait vérifier par des expériences d'immunoprécipitation si Egr-1 affecte la liaison de Sp1 au niveau du promoteur de PPAR γ par compétition avec ses co-activateurs. Aussi, nous avons remarqué que la diminution de liaison du facteur Sp1 reste stable dans le temps même en absence d'Egr-1. Il est possible que le site de liaison d'Egr-1/Sp1 fixe un autre facteur de transcription nommé, Sp3. On pourrait donc analyser l'effet de l'IL-1 β sur ce facteur de transcription au niveau des chondrocytes articulaires. Après, il faut déterminer par des expériences de CHIP si Sp3 se fixe sur le site de liaison d'Egr-1/Sp1 au niveau du promoteur de PPAR γ . Par la suite, confirmer par de siRNA l'implication de ce facteur de transcription dans la répression de PPAR γ . Parallèlement, il

serait nécessaire de vérifier si des modifications post-traductionnelles ciblent le facteur Sp1, et si elles sont responsables de sa faible liaison au niveau du promoteur de PPAR γ .

Aussi, nous avons constaté qu'en absence d'IL-1 β , Egr-1 n'as pas d'effet sur l'activité du promoteur de PPAR γ . Comme pour Sp1, on ne peut pas exclure la possibilité que la liaison d'Egr-1 au niveau du promoteur de PPAR γ pourrait être affectée par des modifications post-traductionnelles déclenchées par des enzymes induites par l'IL-1 β . L'utilisation *in vitro* des inhibiteurs spécifiques des enzymes responsables de ces modifications nous permettra de confirmer l'implication de ce mécanisme dans l'altération de l'expression de PPAR γ .

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons rapporté que PPAR γ et la L-PGDS présentent des propriétés anti-arthrosiques en favorisant la diminution de la production des médiateurs inflammatoires et cataboliques. Contrairement à l'expression de PPAR γ qui diminue et celle de la L-PGDS qui augmente, l'expression des autres isoformes de PPARs, PPAR α et PPAR β ainsi que H-PGDS n'a pas changé au fil du temps, ce qui mène à penser qu'ils ne jouent pas un rôle important dans le développement de cette maladie chez les deux modèles animaux utilisés.

Contrairement au PPAR γ , le rôle de la L-PGDS et d'Egr-1 *in vivo* n'est pas bien étudié. Pour compléter ce travail, on pourrait utiliser des souris déficientes en L-PGDS et Egr-1 afin d'analyser le rôle de ces deux facteurs dans le développement de l'OA induite et spontanée. Les changements histologiques du cartilage nous donneront une idée sur le rôle de ces deux facteurs dans la progression de cette maladie. Aussi, en comparaison avec les souris contrôles, on pourrait identifier les médiateurs ciblés par ces deux facteurs pour ralentir ou favoriser le développement de cette maladie dans les deux types d'OA.

Finalement, les résultats obtenus au cours de ce projet indiquent clairement le rôle important de PPAR γ , de la L-PGDS et d'Egr-1 dans la physiopathologie de l'OA, et que la maîtrise du niveau de production de ces trois facteurs pourrait avoir des effets bénéfiques contre le développement et l'évolution de cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE

A

Arden, N., et Nevitt, M.C., Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006. 20(1): p. 3-25.

Aigner, T., et al., Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res*, 2004. 7(2): p. 134-45.

Anderson, J.J., et 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(1): p. 179-89.

Anandacoomarasamy, A., et March, L., Current evidence for osteoarthritis treatments. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2010. 2(1): p. 17-28.

Aigner, T., et McKenna, L., Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci*, 2002. 59(1): p. 5-18.

Aigner, T., et Dudhia, J., Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann Rheum Dis*, 1997. 56(5): p. 287-291.

Ashraf, S., et Walsh, D.A., Angiogenesis in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 2008. 20(5): p. 573-80.

Attur, M., et al., Targeting the synovial tissue for treating osteoarthritis (OA): where is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2010. 24(1): p. 71-9.

Ashraf, S., et al., Angiogenesis and the persistence of inflammation in a rat model of proliferative synovitis. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(7): p. 1890-8.

Ahmad, R., et al., Adaptor proteins and Ras synergistically regulate IL-1-induced ADAMTS-4 expression in human chondrocytes. *J Immunol*, 2009. 182(8): p. 5081-7.

Attur, M.G., et al., Functional genomic analysis of type II IL-1beta decoy receptor: potential for gene therapy in human arthritis and inflammation. *J Immunol*, 2002. 168(4): p. 2001-10.

Attur, M.G., et al., Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention. *J Biol Chem*, 2000. 275(51): p. 40307-15.

Alaaeddine, N., et al., Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol*, 1997. 24(10): p. 1985-94.

Aderka, D., et al., Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med*, 1992. 175(2): p. 323-9.

Armstrong, S.A., et al., Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13489-95.

Attur, M.G., et al., Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(6): p. 1050-3.

Alaaeddine, N., et al., Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. *Arthritis Rheum*, 1999. 42(4): p. 710-8.

Abramson, S.B., Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16 (Suppl 2): S15-20.

Attur, M., et al., Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. *J Immunol*, 2008. 181(7): p. 5082-8.

Abramovitz, M., et al., The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1483(2): p. 285-93.

Alexander, C.L., et al., Prostaglandin analog treatment of glaucoma and ocular hypertension. *Ann Pharmacother*, 2002. 36(3): p. 504-11.

Afif, H., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 expression is diminished in human osteoarthritic cartilage and is downregulated by interleukin-1 β in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9(2): R31.

Ahmadian, M., et al., PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine*, 2013. (99): p. 557-566.

Abdulkadir, S.A., et al., Frequent and early loss of the EGR1 corepressor NAB2 in human prostate carcinoma. *Hum Pathol*, 2001. 32(9): p. 935-9.

Ainbinder, E., et al., Mechanism of rapid transcriptional induction of tumor necrosis factor alpha-responsive genes by NF-kappaB. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(18): p. 6354-62.

Armstrong, S.A., et al., Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13489-95.

B

Burr, D.B., et Gallant, M.A., Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. 8(11): p. 665-73.

Baldwin, C.T., et al., Absence of linkage or association for osteoarthritis with the vitamin D receptor/type II collagen locus: the Framingham Osteoarthritis Study. *J Rheumatol*, 2002. 29(1): p. 161-5.

Bergink, A.P., et al., Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(7): p. 1913-22.

Blankenhorn, G., Clinical effectiveness of Spondyvit (vitamin E) in activated OAs. A multicenter placebo-controlled double-blind study. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 1986. 124(3): p. 340-3.

Brand, C., et al., Vitamin E is ineffective for symptomatic relief of knee osteoarthritis: a six month double blind, randomised, placebo controlled study. *Ann Rheum Dis*, 2001. 60(10): p. 946-9.

Berenbaum, F., et Sellam, J., Obésité et OA : quels liens ? *Revue du Rhumatisme*, 2008. 75: p. 937-938.

Bahr, R., et Holme, I., Risk factors for sports injuries-a methodological approach. *Br J Sports Med*, 2003. 37(5): p. 384-392.

Buckwalter, J.A., Sports, joint injury, and posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2003. 33(10): p. 578-88.

Bombardier, C., et al., Alliance de l'arthrite du Canada. L'impact de l'arthrite au Canada: Aujourd'hui et au cours des 30 prochaines années, automne 2011, p. 12-13.

Blackburn, T.A., et Craig, E., Knee anatomy: a brief review. *Phys Ther*, 1980. 60(12): p. 1556-60.

Bhosale, A.M., et Richardson, J.B., Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*, 2008. 87: p. 77-95.

Buckwalter, J. A., et Mankin, H.J., Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *J Bone Joint Surg Am*, 1997. 79(4): p. 600-11.

Buckwalter, J.A., et al., Age-related changes in articular cartilage proteoglycans: electron microscopic studies. *J Orthop Res*, 1985. 3(3): p. 251-7.

Buckwalter, J.A., et Rosenberg, L.C., Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev*, 1988. 1(1): p. 87-112.

Broom, N.D., et Poole, C.A., A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition. *J Anat*, 1982. 135(Pt 1): p.65-82.

Burr, D.B., et Gallant, M.A., Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. 8(11): p. 665-73.

Brandt, K .D., et al., Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65(10): p. 1261-1264.

Benito, M.J., et al., Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2005. 64(9): p. 1263-7.

Bonnet, C.S., et Walsh, D.A., Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*, 2005. 44(1): p. 7-16.

Buckland-Wright, C., Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004. 12 Suppl A: S10-9.

Bobinac, D., et al., Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone*, 2003. 32(3):p. 284-90.

Buckland-Wright, J.C., et al., Fractal signature analysis measures cancellous bone organisation in macroradiographs of patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1996. 55(10): p. 749-755.

Byoung Ju, K., et al., Comparison between Subchondral Bone Change and Cartilage Degeneration in Collagenase- and DMM- induced Osteoarthritis (OA) Models in Mice. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2013. 10(4): p. 211-217.

Batiste, D.L., et al., Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004. 12(12): p. 986-96.

Boyd, S.K., et al., Early regional adaptation of periarticular bone mineral density after anterior cruciate ligament injury. *J Appl Physiol* (1985), 2000. 89(6): p. 2359-64.

Bailey, A.J., et al., Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. 34(2): p. 176-82.

Billinghurst, R.C., et al., Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *Clin Invest*, 1997. 99(7): p. 1534-45.

Brew, K., et al., Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1477(1-2): p. 267-83.

Baker, A.H., et al., Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 19): p. 3719-27.

Barksby, H.E., et al., Matrix metalloproteinase 10 promotion of collagenolysis via procollagenase activation: implications for cartilage degradation in arthritis. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(10): p. 3244-53.

Stanton, H., et al., Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1812(12): p. 1616-29.

Blaney Davidson, E.N., et al., Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65(11): p. 1414-21.

Blaney Davidson, E.N., et al., Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther*, 2005. 7(6): R1338-47.

Blaney Davidson, E.N., et al., TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. 15(6): p. 597-604.

Bakker, A.C., et al., Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. 9(2): p. 128-36.

Bobacz, K., et al., Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(9): p. 2501-8.

Boraschi, D., et Tagliabue, A., The interleukin-1 receptor family. *Vitam Horm*, 2006. 74: p. 229-54.

Brennan, F.M., et al., Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints. *Eur J Immunol*, 1992. 22(7): p. 1907-12.

Bu, R., et al., Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. *Bone*, 2003. 33(5): p. 760-70.

Boulangier, M.J., et al., Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*, 2003. 300(5628): p. 2101-4.

Benderdour, M., 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-1beta. *J Rheumatol*, 2002. 29(6): p. 1262-72.

Blanco, F.J., et al., Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*, 1995. 146(1): p. 75-85.

Boileau, C., et al., 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*, 2002. 46(10): p. 2637-47

Burke, J.E., et Dennis, E.A., Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*, 2009. 50 Suppl: S237-42.

Brown, W.J., et al., Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic*, 2003. 4(4): p. 214-21.

Bos, C.L., et al. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(7): p. 1187-205.

Burkey, T.H., et Regan, J.W., Activation of mitogen-activated protein kinase by the human prostaglandin EP3A receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 211(1): p. 152-8.

Boyault, S., et al. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, but not troglitazone, modulates IL-1 β effects in human chondrocytes by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation pathways. *FEBS Letters*, 2001. 501(3): p. 24-30.

Brodie, M.J., et al., Is prostacyclin in the major pro-inflammatory prostanoid in joint fluid? *Life Sci*, 1980. 27(7): p. 603-8.

Basu, S., et al., Raised levels of F(2)-isoprostanones and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 2001. 60(6): p. 627-31.

- Braissant, O., et al., Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 1996. 137(1): p. 354-66.
- Barrera, G., et al., The Role of PPAR Ligands in Controlling Growth-Related Gene Expression and their Interaction with Lipoperoxidation Products. *PPAR Res.*, 2008. 2008: ID 524671, p.15.
- Bishop-Bailey, D., et Wray, J., Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2003. 71(1-2): p. 1-22.
- Berger, J., et Moller, D .E., The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 2002. 53: p. 409-35.
- Boileau, C., et al., 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(7): p. 2288-98.
- Bendele, A.M., Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskel Neuron Interact*, 2001. 1(4): p. 363-376.
- Bian, Q., et al., Osteoarthritis: genetic factors, animal models, mechanisms, and therapies. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012. 4: p. 74-100.
- Bendele, A.M., et al., Osteoarthrosis in guinea pigs: histopathologic and scanning electron microscopic features. *Lab Anim Sci*, 1989. 39(2): p. 115-21.
- Bendele, A.M., et Hulman, J.F., Spontaneous cartilage degeneration in guinea pigs. *Arthritis Rheum*, 1988. 31(4):561-5.
- Balbín, M., et al., Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem*, 2001. 276(13): p. 10253-62.
- Bendele, A.M., Animal models of osteoarthritis in an era of molecular biology. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2002. 2(6): p. 501-3.
- Barve, R.A., et al., Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. 15(10): p. 1190-8.

Brown, T.D., et Shaw, D.T., In vitro contact stress distribution on the femoral condyles. *J Orthop Res*, 1984. 2(2): p. 190-9.

Bendele, A.M., et Hulman, J.F., Effects of body weight restriction on the development and progression of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum*, 1991. 34(9): p. 1180-4.

Brandt, K.D., et al., Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65(10): p. 1261-4.

Bordji, K., et al., Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem*, 2000. 275(16): p. 12243-50.

Bahouth, S.W., et al., Reciprocal regulation of beta(1)-adrenergic receptor gene transcription by Sp1 and early growth response gene 1: induction of EGR-1 inhibits the expression of the beta(1)-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol*, 2002. 61(2): p. 379-90.

Baugé, C., et al., NFkappaB mediates IL-1beta-induced down-regulation of TbetaRII through the modulation of Sp3 expression. *J Cell Mol Med*, 2008. 12(5A): p. 1754-66.

C

Carr, A.J., Beyond disability: measuring the social and personal consequences of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. 7(2): p. 230-8.

Craig, F.M., et al., A role for hyaluronan in joint development. *J Anat*. Aug, 1990. 171: p. 17-23.

Carroll, G.J., HFE gene mutations are associated with osteoarthritis in the index or middle finger metacarpophalangeal joints. *J Rheumatol*, 2006. 33(4): p. 741-3.

Chevalier, X., et Richette P., Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement Normal joint cartilage: anatomy, physiology, metabolism, ageing. *EMC - Rhumatologie-Orthopedie*, 2005. 2 (1): p. 41-58

Cirillo, D.J., et al., Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(10): p. 3194-204.

Cooper, C., et al., Occupational activity and osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis*, 1994. 53(2): p. 90-3.

Cooney, W.P., et Chao, E.Y., Biomechanical analysis of static forces in the thumb during hand function. *J Bone Joint Surg Am*, 1977. 59(1): p. 27-36.

Chakravarty, E.F., Long distance running and knee osteoarthritis. A prospective study. *Am J Prev Med*, 2008. 35(2): p. 133-8.

Cibere, J., Do we need radiographs to diagnose osteoarthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006.20(1): p. 27-38.

Cohen, N.P., et al., Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther*, 1998. 28(4): p. 203-15.

Chivers, M.D., et Howitt, S.D., Anatomy and physical examination of the knee menisci: a narrative review of the orthopedic literature. *J Can Chiropr Assoc*, 2009. 53(4): p. 319-33.

Clancy, W.G. J.r., et al., Treatment of knee joint instability secondary to rupture of the posterior cruciate ligament. Report of a new procedure. *J Bone Joint Surg Am*, 1983. 65(3): p. 310-322

Clarke, B., Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. Suppl 3: S131-9.

Cicuttini, F.M., et Wluka, A.E., Osteoarthritis: Is OA a mechanical or systemic disease? *Nat Rev Rheumatol*, 2014. 10(9): p. 515-6.

Corvol, M., Le chondrocyte : du vieillissement cellulaire au chondrocyte arthrosique *Rev Rhum*, 2000. 67: p. 673-6.

Cohen-Solal, M., et al., Animal models of osteoarthritis for the understanding of the bone contribution. *Bonekey Rep*, 2013. 2: p. 422.

Couchourel, D., et al., Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(5): p. 1438-50.

Canalis, E., et al., Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annu Rev Med*, 1991. 42: p. 17-24

Chantrain C., et DeClerck Y. A., Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Medecine /Sciences*, 2002. 18: p. 565-75

Collier, S., et Ghosh, P., The role of plasminogen in interleukin-1 mediated cartilage degradation. *J Rheumatol*, 1988. 15(7): p. 1129-37.

Chevalier, X., et Tyler, J.A., 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(6): p. 515-22.

Chia, S.L., et al., Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(7): p. 2019-27.

Cho, M.L., et al., Interleukin-18 induces the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via AP-1-dependent pathways. *Immunol Lett*, 2006. 103(2): p. 159-66.

Chen, B., et al., Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations. *J Int Med Res*, 2014. 42(1): p. 138-44.

Chevalier, X., et al., Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments. *Nat Rev Rheumatol*, 2013. 9(7): p. 400-10.

Chandrasekharan, N.V., et al., COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(21): p. 13926-31.

Clausen, J., Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1961. 107: p.170-2.

Curran, T., et Franza, BR. Jr., Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*, 1988. 55(3): p. 395-7.

Cruzalegui, F. H., et al., c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J*, 1999. 18(5): p. 1335–1344.

Cao, X., et al., Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J Biol Chem*, 1993. 268(23): p. 16949-57.

Calvo, E., et al., High-resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. 9(5): p. 463-72.

Clockaerts, S., et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha activation decreases inflammatory and destructive responses in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011. 19(7): p. 895-902.

Chan, B.Y., et al., PPAR agonists modulate human osteoclast formation and activity in vitro. *Bone*, 2007. 40(1): p. 149-59.

Chaudhary, L.R., et al., Induction of early growth response-1 gene by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in normal human bone marrow stromal and osteoblastic cells: regulation by a protein kinase C inhibitor. *Mol Cell Biochem*, 1996. 156(1): p. 69-77.

Chen, C.J., et al., Attenuation of c-Jun and Sp1 expression and p300 recruitment to gene promoter confers the trichostatin A-induced inhibition of 12(S)-lipoxygenase expression in EGF-treated A431 cells. *Eur J Pharmacol*, 2008. 591(1-3): p. 36-42.

Cheng, S., et al., Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J Biol Chem*, 2004. 279(21): p. 22057-65.

D

Dieppe, P., et Kirwan, J., The localization of osteoarthritis. *Br J Rheumatol*, 1994. 33(3): p. 201-3.

Dillon, C.F., et al., Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1991-94. *J Rheumatol*, 2006. 33(11): p. 2271-9.

De Klerk, B. M., et al., Limited evidence for a protective effect of unopposed oestrogen therapy for osteoarthritis of the hip: a systematic review. *Rheumatology*, 2009. 48(2): p. 104-112.

Dodd, A.W. et al., A rare variant in the osteoarthritis-associated locus GDF5 is functional and reveals a site that can be manipulated to modulate GDF5 expression. *Eur J Hum Genet*, 2013. 21(5): p. 517-21.

De Lange-Brokaar, B.J., et al., Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012. 20(12): p. 1484-99.

Ding, M., et al., Changes in the three-dimensional microstructure of human tibial cancellous bone in early osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br*, 2003. 85(6): p. 906-12.

Ding, M., et al., Age-Related Three-Dimensional Microarchitectural Adaptations of Subchondral Bone Tissues in Guinea Pig Primary Osteoarthrosis. *Calcif Tissue Int*, 2006. 78: p. 113-122.

Dean, D.D., et al., Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 1989. 84(2): p. 678-85.

Davidson, R.K., et al., Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther*, 2006. 8(4): p. R124.

Dean, D. D., et al., Levels of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human osteoarthritic cartilage. *J. Rheumatol*, 1987. 14(Suppl): p. 43-44.

De Ceuninck, F., et al., Pharmacological disruption of insulin-like growth factor 1 binding to IGF-binding proteins restores anabolic responses in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 2004. 6(5): R393-403.

Dinarello, C.A., Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol*, 2013. 25(6): p. 389-93.

Dempsey, P.W., et al., The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. 14(3-4): p. 193-209.

De Hooge, A.S., et al., Male IL-6 gene knock out mice developed more advanced osteoarthritis upon aging. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13(1): p. 66-73.

Dai, S.M., et al., Implication of interleukin 18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis: direct effect on chondrocytes may not be pivotal. *Ann Rheum Dis*, 2005. 64(5): p. 735-42.

Dubois, R.N., et al., Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 1998. 12(12): p. 1063-73.

Durand, M., et al., Prostaglandin D2 receptors control osteoclastogenesis and the activity of human osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 2008. 23(7): p. 1097-105.

Desvergne, B., et Wahli, W., Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 1999. 20(5): p. 649-88.

De Cesare, D., et al., Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of *c-fos* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(21): p. 12202–12207.

Davis, M.A., et al., The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee. *Am J Epidemiol*, 1989. 130(2): p. 278-88.

Dumond, H., et al., Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004. 12(4): p. 284-95.

Dumond, H., et al., Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(11): p. 3118-29.

David, V., et al., Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology*, 2007. 148(5): p. 2553-62.

Davis, W.Jr., et al., Reciprocal regulation of expression of the human adenosine 5'-triphosphate binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2) promoter by the early growth response-1 (EGR-1) and Sp-family transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(3): p. 1097-107.

Decker, E.L., Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(3): p. 911-21.

E

Eeckhout, Y., et Vaes, G., Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J*, 1977. 166(1): p. 21-31.

Edwards, D.R., et al., Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J*, 1987. 6(7): p. 1899-904.

Eviatar, T., et al., Synthesis of insulin-like growth factor binding protein 3 in vitro in human articular cartilage cultures. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(2): p. 410-7.

Ellman, M.B., et al., Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis. *J Cell Biochem*, 2013, 114(4): p. 735-42.

Elbrecht, A., et al. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 224(2): p. 431-7.

Erdmann, E., et al., Thiazolidinediones and Cardiovascular Risk — A Question of Balance. *Curr Cardiol Rev*, 2009. 5(3): p. 155-165.

Evans, R.G., et al., Radiological scoring of osteoarthritis progression in STR/ORT mice. *Osteoarthritis Cartilage*, 1994. 2(2): p. 103-9.

Emili, A., et al., Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(3): p. 1582-93.

F

Felson, D.T., Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med*, 2000. 133(8): p. 635-46.

Felson, D.T., et al., The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*, 1987. 30(8): p. 914-8.

Felson, D.T., et Zhang, Y., An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(8): p. 1343-55.

Figenschau, Y., et al., Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 287(1): p. 190-7.

Felson, D.T. et al., Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J Rheumatol*, 1991. 18(10): p. 1587-92.

Felson, D.T., Preventing knee and hip osteoarthritis. *Bull Rheum Dis*, 1998. 47(7): p. 1-4.

Fox, A.J., et al., The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function. *Sports Health*, 2012. 4(4): p. 340-51.

Fukui, N., et al., 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: p. 59-66.

Flechtenmacher, J., et al., Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(11): p. 1896-904.

Fortier, L.A., et al., The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, 2011. 469(10): p. 2706-15.

Fernihough, J.K., et al., Local disruption of the insulin-like growth factor system in the arthritic joint. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(9): p. 1556-65.

Fernandes, J.C., et al., The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*, 2002. 39(1-2): p. 237-46.

Flannery, C.R., et al., IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Matrix Biol*, 2000. 19(6): p. 549-53.

Futani, H., et al., Relation between interleukin-18 and PGE2 in synovial fluid of osteoarthritis: a potential therapeutic target of cartilage degradation. *J Immunother*, 2002. 25 (Suppl 1): S61-4.

Fermor, B., et al., Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *Eur Cell Mater*, 2007. 13: p. 56-65.

Fahmi, H., mPGES-1 as a novel target for arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. 16(5): p. 623-7.

Faveeuw, C., et al., Prostaglandin D2 inhibits the production of interleukin-12 in murine dendritic cells through multiple signaling pathways. *Eur J Immunol*, 2003. 33(4): p. 889-98.

Fahmi, H., et al., 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): p. 595-607.

Fajas, L., et al., The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *Biol Chem*, 1997. 272(30): p. 18779-89.

Fajas, L., et al., PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*, 1998. 438(1-2): p. 55-60.

Forman, B.M., et al., Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(9): p. 4312-4317.

Fahmi, H., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in osteoarthritis. *Mod Rheumatol*, 2011. 21(1): p. 1-9.

Fahmi, H., et al., 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): p. 845-8.

Fahmi, H., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts likely by reducing the binding of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(2): p. 100-8.

Fu, M., et al., Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene*, 2003. 315: p. 33-41.

Feldman, B.J., et Feldman, D., The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*, 2001. 1(1): p. 34-45.

Forman BM1 et al., 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, 1995. 83(5): p. 803-12.

Fernandes, J.C., et al., Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol*, 1998. 25(8): p. 1585-94.

François, M., et al., Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway potentiates interleukin-1 receptor antagonist production in cytokine-treated chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(4): p. 1233-45.

Fujimori, K., et al., Regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression by Hes-1 through E-box and interleukin-1 beta via two NF-kappa B elements in rat leptomeningeal cells. *J Biol Chem*, 2003. 278(8): p. 6018-26.

Fernández-Alvarez. A., et al., Reciprocal regulation of the human sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1a promoter by Sp1 and EGR-1 transcription factors. *FEBS Lett*, 2008. 582(2): p. 177-84.

G

Goldring, M.B., Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *HSSJ*, 2012. 8: p.7-9.

Goldring, M.B., et Goldring, S. R., Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology*, 2007. 213(3): p. 626-634.

Gabriel, S.E., Michaudn, K., Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(3): p. 229.

Gospodarowicz, D., et al., Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev*, 1987. 8(2): p. 95-114.

Goekoop, R.J., et al., Determinants of absence of osteoarthritis in old age. *Scand J Rheumatol*, 2011. 40 (1): p. 68-73.

Goekoop, R.J., et al., Low innate production of interleukin-1beta and interleukin-6 is associated with the absence of osteoarthritis in old age. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. 18(7): p. 942-7.

Grazio, S., et Balen, D., Obesity: risk factor and predictor of osteoarthritis. *Lijec Vjesn*, 2009. 131(1-2): p. 22-6.

Gabay, O., et al., OA et obésité : modèles expérimentaux. *Revue du Rhumatisme*, 2008. 75(12): p. 1215–1219.

- Greenwald, A.S., et Haynes, D.W., A pathway for nutrients from the medullary cavity to the articular cartilage of the human femoral head. *J Bone Joint Surg Br*, 1969. 51(4): p. 747-53.
- Gray, J.C., Neural and vascular anatomy of the menisci of the human knee. *J Orthop Sports Phys Ther*, 1999. 29(1): p. 23-30.
- Gupte, C.M., et al., Meniscofemoral ligaments revisited. Anatomical study, age correlation and clinical implications. *J Bone Joint Surg Br*, 2002. 84(6): p. 846-51.
- Goldring, M.B., et Goldring, S.R., Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. 1192: p. 230-7.
- Goldring, M.B., The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(9):1916-26.
- Gomez-Camarillo, M.A., et Kouri J.B., Ontogeny of rat chondrocyte proliferation: studies in embryo, adult and osteoarthritic (OA) cartilage. *Cell Res*, 2005. 15(2): p. 99-104.
- Gallwitz, W.E., et al., 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. *J Biol Chem*, 1993. 268(14): p. 10087-94.
- Gross, J., et Lapierre, C.M., Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci*, 1962. 48: p. 1014–1022.
- Galasso, O., et al., Recent Findings on the Role of Gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) in Osteoarthritis. *Advances in Orthopedics*, 2012. p. 7.
- Gendron, C., et al., Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *J Biol Chem*, 2007. 282(25): p. 18294-306.
- Glasson, S.S., et al., Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*, 2005. 434(7033):p. 644-8.
- Chubinskaya, S., et al., Effects induced by BMPS in cultures of human articular chondrocytes: comparative studies. *Growth Factors*, 2008. 26(5): p. 275-83.
- Chubinskaya, S., et al., Response of human chondrocytes prepared for autologous implantation to growth factors. *J Knee Surg*, 2008. 21(3): p. 192-9.
- Gooz, M., ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010. 45(2): p. 146-69.

Guerne, P.A., et al., IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol*, 1990. 144(2): p. 499-505.

Guerne, P.A., et al., Effects of IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes: comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone. *Matrix Biol*, 1999. 18(3): p. 253-60.

Ghosh, M., et al., Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res*, 2006. 45(6): p. 487-510.

Gosset, M., et al., Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. *Arthritis Res Ther*, 2006. 8(4): R135.

Gachon, A.M.F., Lipocalines et transport de ligands hydrophobes. *médecine/ sciences*, 1994. 10: p. 22-9.

Gallant, M.A., et al., 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): p. 672-81.

Greene, M.E., et al., Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*, 1995. 4(4-5): p. 281-99.

Glass, C.K., et al., Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. 9(2): p. 222-32.

Gashler, A.L., et al., A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol*, 1993. 13(8): p. 4556-71.

Goldring, M.B., Do mouse models reflect the diversity of osteoarthritis in humans? *Arthritis Rheum*, 2012. 64(10): p. 3072-3075.

Glasson, S.S., et al., The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. (9): p. 1061-9.

Guzman, R.E., et al., Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol*, 2003. 31(6): p. 619-24.

Guingamp, C., et al., Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(9): p. 1670-9.

Guilherme, A., et al., Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-mediated cleavage of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes. *J Biol Chem*, 2009. 284(25): p. 17082-91.

Grimmer, C.I., et al., Hypoxia-inducible factor 1alpha is involved in the prostaglandin metabolism of osteoarthritic cartilage through up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(12): p. 4084-94.

Grygiel-Górniak, B., Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J*, 2014. 13: p. 17.

Guesdon, F., et al., Specific activation of beta-casein kinase by the inflammatory cytokines interleukin 1 and tumour necrosis factor. *Biochem J*, 1994. 304(Pt 3): p. 61-768.

Chen, C.J., et al., Attenuation of c-Jun and Sp1 expression and p300 recruitment to gene promoter confers the trichostatin A-induced inhibition of 12(S)-lipoxygenase expression in EGF-treated A431 cells. *Eur J Pharmacol*, 2008. 591(1-3): p. 36-42.

Gill G., et al., A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(1): p. 192-196.

H

Hoaglund, F.T., et Steinbach L.S., Primary osteoarthritis of the hip: etiology and epidemiology. *J Am Acad Orthop Surg*, 2001. 9(5): p. 320-7

Hügler, T., et al., Aging and osteoarthritis: an inevitable encounter? *J Aging Res*, 2012. p. 7.

Hollander, A.P., Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest*, 1995. 96(6): p. 2859-2869.

Huang, J., et al., Vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis of the hand, hip, and knee: a case-control study in Japan. *Rheumatology (Oxford)*, 2000. 39(1): p. 79-84.

Hart, D.J., et Spector, T.D. The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study. *J Rheumatol*, 1993. 20(2): p. 331-5.

Hu, P.F., et al., The emerging role of adipokines in osteoarthritis: a narrative review. *Mol Biol Rep*, 2011. 38(2): p. 873-8.

Herzog, W., et al., Resultant and local loading in models of joint disease. *Arthritis Rheum*, 2003. 49(2): p. 239-47.

Hinton, R., et al., Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. *Am Fam Physician*, 2002. 65(5): p. 841-8.

Heidari, B., Knee osteoarthritis diagnosis, treatment and associated factors of progression: part II. *Caspian J Intern Med*, 2011. 2(3): p. 249-55.

Henrotin, Y., et al., What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? *Maturitas*, 2014. 78(3): p. 184-7.

Hunter, D.J., The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2014. 10(7): p. 437-41.

Hodge, J.A., et McKibbin B., The nutrition of mature and immature cartilage in rabbits. An autoradiographic study. *J Bone Joint Surg Br*, 1969. 51(1): p. 140-7.

Hadjidakis, D.J., et Androulakis, II., Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1092: p. 385-96.

Henrotin, Y., et al., Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. *Osteoporos Int*, 2012. Suppl 8: S847-51.

Henter, D .J., et Felson D.T., Osteoarthritis. *BMJ*, 2006. 332(7542): p. 639-642.

Hunter, D.J. Pharmacologic therapy for osteoarthritis--the era of disease modification. *Nat Rev Rheumatol*, 2011. 7(1): p. 13-22.

Horton, W.E. J.r., et al., Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006. 6(4): p. 379-81.

Hashimoto, S., et al., Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(3): p. 180-7.

Hasty, K.A., et al., The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem*, 1987. 262(21): p. 10048-52.

Hart, D.A., et Rehemtulla, A., Plasminogen activators and their inhibitors: regulators of extracellular proteolysis and cell function. *Comp Biochem Physiol B*, 1988. 90(4): p. 691-708.

Hui, W., et al., Modulation of the expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases by TGF-beta1 and IGF-1 in primary human articular and bovine nasal chondrocytes stimulated with TNF-alpha. *Cytokine*, 2001. 16(1): p. 31-5.

- Hayashi, M., et al., Weekly intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 inhibits osteoarthritis progression. *Arthritis Res Ther*, 2008. 10(5): R118.
- Hauptmann, B., et al., Modulation of IL-1 inflammatory and immunomodulatory properties by IL-6. *Eur Cytokine Netw*, 1991. 2(1): p. 39-46.
- Honorati, M.C., et al., Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(10): p. 799-807.
- Honorati, M.C., et al., VEGF production by osteoarthritic chondrocytes cultured in micromass and stimulated by IL-17 and TNF-alpha. *Connect Tissue Res*, 2007. 48(5): p. 239-45.
- Héту, P.O., et Riendeau, D. Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. *Biochem J*, 2005. 391(Pt 3): p. 561-566.
- Helliwell, R.J., et al., Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2004. 70(2): p. 101-13.
- Harada, S., et al., Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest*, 1994. 93(6): p. 2490-6.
- Hirata, M., et al., Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91(23): p. 11192-11196.
- Hirai, H., 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(2): p. 255-61.
- Huang, J.C., The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the development and physiology of gametes and preimplantation embryos. *PPAR Res*, 2008. 2008: ID 732303, p. 7.
- Horwitz, K.B., et al., Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol*. 1996 Oct;10(10): p. 1167-77.
- Hoffmann, E., et al., Transcriptional regulation of EGR-1 by the interleukin-1-JNK-MKK7-c-Jun pathway. *J Biol Chem*, 2008. 283(18): p. 12120-8.
- Huebner, J.L., et al., Collagenase 1 and collagenase 3 expression in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(5): p. 877-90.

Huebner, J.L., et al., Transglutaminase 2 is a marker of chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis severity in the Hartley guinea pig model of knee OA. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. (8): p. 1056-64.

Huang, R.P., et Adamson, E.D., The phosphorylated forms of the transcription factor, Egr-1, bind to DNA more efficiently than non-phosphorylated. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 200(3): p. 1271-6.

Huang, R.P., et Adamson, E.D., Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism. *DNA Cell Biol*, 1993. 12(3): p. 265-73.

I

Ingvarsson, T., Prevalence of hip osteoarthritis in Iceland. *Ann Rheum Dis*, 1999. 58(4): p. 201-7.

Iwanaga, T., Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol*, 2000. 63(1): p. 17-31.

Imhof, H., et al., Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol*, 2000. 35(10): p. 581-8.

John, W.H., et al., *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater*, De Boeck, 2008. p. 189.

Ishiguro, N., et al., Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci*, 2002. 65(3-4): p. 73-84.

Inerot, S., et Heinegard, D., Articular-cartilage proteoglycans in aging and osteoarthritis. *Biochem J*, 1978. 169(1): p. 143-156.

Intema, F., et al., In early OA, thinning of the subchondral plate is directly related to cartilage damage: results from a canine ACLT-meniscectomy model. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. 18(5): p. 691-8.

Ishiguro, N., et al., Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci*, 2002. 65(3-4): p. 73-84.

Imai, K., Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol*, 1997. 151(1): p. 245-256.

Im, H.J., et al., Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes. *J Biol Chem*, 2007. 282(15):11110-21.

Inoue, H., et al., High levels of serum IL-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis. *Bone*, 2008. 42(6): p. 1102-10.

Iannone, F., et al., Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol*, 2001. 19(2): p. 139-45.

Inoue, T., et al., Mechanism of metal activation of human hematopoietic prostaglandin D synthase. *Nat Struct Biol*, 2003. 10(4): p. 291-6.

J

Jordan, J.M., 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(1): p. 172-80.

Jin, S.Y., et al., Estrogen receptor-alpha gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population. *Arthritis Res Ther*, 2004. 6(5): R415-21.

Jomha, N.M., et al., Long-term osteoarthritic changes in anterior cruciate ligament reconstructed knees. *Clin Orthop Relat Res*, 1999. (358): p. 188-93.

Jian, P.Wu., et al., Study of the collagen structure in the superficial zone and physiological state of articular cartilage using a 3D confocal imaging technique. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2008. 3: p. 29.

Jingushi, S., et al. Transient exposure of fibroblast growth factor-2 induced proliferative but not destructive changes in mouse knee joints. *Connect Tissue Res*, 2006. 47(4): p. 242-8.

Joosten, L.A., et al., IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol*, 1999. 163(9): p. 5049-55.

Jikko, A., et al., Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures. *Cell Biol Int*, 1998. 22(9-10): p. 615-21.

Jouzeau, J.Y., et al., Pharmacology and classification of cyclooxygenase inhibitors. *Gastroenterol Clin Biol*, 2004. 28(Spec No 3): p. C7-17.

Ji, J.D., et al., Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun*, 2001. 17(3): p. 215-21.

Juge-Aubry, C., et al., DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*, 1997. 272(40): p. 25252-9.

Ji, J.D., et al., Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun*, 2001. 17(3): p. 215-21.

Janusz, M.J., et al., Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(10): p. 785-91.

Johnson, K., et al., Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(4): p. 1216-25

Joo, M., et al., Induction and function of lipocalin prostaglandin D synthase in host immunity. *J Immunol*, 2007. 179(4): p. 2565-75.

K

Kang, J.E., et al., Histone deacetylase-1 represses transcription by interacting with zinc-fingers and interfering with the DNA binding activity of Sp1. *Cell Physiol Biochem*, 2005. 16(1-3): p. 23-30.

Kang, J.E., et al., Histone deacetylase-1 represses transcription by interacting with zinc-fingers and interfering with the DNA binding activity of Sp1. *Cell Physiol Biochem*, 2005. 16(1-3): p. 23-30.

Keen, R.W., et al., Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(8): p. 1444-9.

Kivimäki, J., et al., Knee disorders in carpet and floor layers and painters. *Scand J Work Environ Health*, 1992. 18(5): p. 310-6.

Kujala, U.M., et al., Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum*, 1995. 38(4): p. 539-46.

Knoop, J., et al., Biomechanical factors and physical examination findings in osteoarthritis of the knee: associations with tissue abnormalities assessed by conventional radiography and high-resolution 3.0 Tesla magnetic resonance imaging. *Arthritis Res Ther*, 2012. 14(5): R212.

Karola, M., et Jizong, G., The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anat*, 1998. 193(Pt 2): p. 61-178.

Klaus Von, D.M., et al., Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture, 1977. *Nature*. 267: p. 531-532.

Kenichiro, k., et al., Regulation of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by Interleukin-1 and Interleukin-6 in Mouse Calvaria: Association of MMP Induction with Bone Resorption. *Endocrinology*, 1998. 139(3): p. 1338-1345.

Knäuper, V., et al., Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem*, 1996. 271(3): p. 1544-50.

Knäuper, V., et al., Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochem J*, 1993. 295 (Pt 2): p. 581-6.

Knäuper, V., et al., Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem*, 1996. 271(29): p. 17124-31.

Kashiwagi, M., et al., Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *J Biol Chem*, 2004. 279(11): p. 10109-19.

Kim, J., et al., IGF-1 Synergizes with BMP7-Mediated Anabolism In Bovine Intervertebral Disc Cells. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(12): p. 3706-3715.

Kapoor, M., et al., Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2011. 7(1): p. 33-42.

Krumm, B., et al., Structural biology of the IL-1 superfamily: key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses. *Protein Sci*, 2014. 23(5): p. 526-38.

Kwan Tat, S., et al., IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. 15(1): p. 49-60.

Kotake, S., et al., Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res*, 1996. 11(1): p. 88-95.

- Koshy, P.J., et al., Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61(8): p. 704-13.
- Kwon, N.S., et al., L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J Biol Chem*, 1990. 265(23): p. 13442-5.
- Kanaoka, Y., et Urade, Y., Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003. 69(2-3): p. 163-7.
- Kanaoka, Y., et al., Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell*, 1997. 90(6): p. 1085-95.
- Kawabe, J., et al. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives - *Circ J*, 2010. 74(5): p. 836-43.
- Kliwer, S.A. et al., Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 1992. 27. 358(6389): p. 771-4.
- Kobayashi, T., et al., Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(2): p. 479-87.
- Kumbrink, J., et al., Egr-1 induces the expression of its corepressor nab2 by activation of the nab2 promoter thereby establishing a negative feedback loop. *J Biol Chem*, 2005. 280(52): p. 42785-93.
- Kliwer, S.A. et al., A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, 1995. 83(5):813-9.
- Kammermann, J.R., et al., Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in canine osteoarthritis: Immunolocalization of TNF-alpha, stromelysin and TNF receptors in canine osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 1996. 4(1): p. 23-34.
- Khachigian, L.M., et al. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1995. 270(46): p. 27679-86.
- Kubosaki, A., et al., Genome-wide investigation of in vivo EGR-1 binding sites in monocytic differentiation. *Genome Biol*, 2009. 10(4): R41.

L

Lee, A.S., et al., A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*, 2013. 527(2): p. 440-7.

Loeser, R.F., Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(5): p. 1357-60.

Loeser, R.F., et al., Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(6): p. 1697-1707.

Loeser, R.F., Aging and Osteoarthritis: The Role of Chondrocyte Senescence and Aging Changes in the Cartilage Matrix. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. 17(8): p. 971-979.

Li, B., et Aspden, R.M., Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res*, 1997. 12(4): p. 641-51.

Lotz, M.K., et Kraus V.B., New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Res Ther*, 2010. 12(3): p. 211.

Linn, S., et al., Role of sex hormones in the development of osteoarthritis. *PMR*, 2012. 4(5 Suppl): S169-73.

Lee, Y.H., Vitamin D receptor TaqI, BsmI and ApaI polymorphisms and osteoarthritis susceptibility: a meta-analysis. *Joint Bone Spine*, 2009. 76(2): p. 156-61.

Loughlin, J., et al., Association of the interleukin-1 gene cluster on chromosome 2q13 with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(6): p. 1519-27.

Lian, K., et al., Estrogen receptor alpha genotype is associated with a reduced prevalence of radiographic hip osteoarthritis in elderly Caucasian women. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. 15(8): p. 972-8.

Lane, N.E., et al., Serum vitamin D levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: a longitudinal study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum*, 1999. 42(5): p. 854-60. Lee, R. et Kean, W.F. Obesity and knee osteoarthritis. *Inflammopharmacology*, 2012. 20(2): p. 53-8.

Linn, F.C., et Sokoloff, L., Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. *Arthritis Rheum*, 1965. 8: p. 481-94.

Lindblad, S., et Hedfors, E., The synovial membrane of healthy individuals--immunohistochemical overlap with synovitis. *Clin Exp Immunol*, 1987. 69(1): p. 41-47.

Last, R.J., Some anatomical details of the knee joint. *J Bone Joint Surg Br*, 1948. 30B(4): p. 683-8.

Landreau, P., et al., Pathologie ligamentaire du genou. Approche pratique en orthopédie-traumatologie, Springer, 2003. p. 36

Laadhar, L., et al., Physiopathologie de l'OA. Du cartilage normal au cartilage arthrosique : facteurs de prédisposition et mécanismes inflammatoires. *La Revue de médecine interne*, 2007. 28 (8): p. 531-536.

Lajeunesse, D., et Reboul, P., The Role of Bone in the Development of Osteoarthritis. *Bone and Osteoarthritis*, 2007. 4: p. 19-39

Li, M., et al., Prostaglandin E2 receptors in bone formation. *Int Orthop*, 2007. 31(6): p. 767-772.

Little, C.B., et al., Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(12): p. 3723-33.

Lohmander, L.S., et al., 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*, 1993. 36(9): p. 1214-22.

Loeser, R.F., et al., The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(8): p. 2188-96.

Luyten, F.P., et al., Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 267(2): p. 416-25.

Li, X., et al., Species-specific biological effects of FGF-2 in articular cartilage: implication for distinct roles within the FGF receptor family. *J Cell Biochem*, 2012 113(7): p. 2532-42.

Locksley, R.M., et al., The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001. 104(4): p. 487-501.

Lyons-Giordano, B., et al., Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *Exp Cell Res*, 1993. 206(1): p. 58-62.

Leistad, L., et al., Presence of secretory group IIa and V phospholipase A2 and cytosolic group IValpha phospholipase A2 in chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med*, 2004. 42(6): p. 602-10.

Leistad, L., et al., Multiple phospholipase A2 enzymes participate in the inflammatory process in osteoarthritic cartilage. *Scand J Rheumatol*, 2011. 40(4): p. 308-16.

LeGrand, A., et al., Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(9): p. 2078-83.

Lader, C.S., et Flanagan, A.M., Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology*, 1998, 139(7): p. 3157-64.

Liang, X. et al., Prostaglandin D2 mediates neuronal protection via the DP1 receptor. *J Neurochem*, 2005. 92(3): p. 477-86.

Lehmann, J.M., et al., An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, 1995. 270(22): p. 12953-6.

Lehmann, J.M., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, 1997. 272(6): p. 3406-10.

Li, X., et al., Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol*, 2005. 32(5): p. 887-95.

Lee, C.G., et al., Early Growth Response Gene 1-mediated Apoptosis Is Essential for Transforming Growth Factor β 1-induced Pulmonary Fibrosis. *J Exp Med*, 2004. 200(3): p. 377-389.

Lee, S.L., et al., Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science*, 1996. 273(5279): p. 1219-21.

Longo, U.G., et al., Osteoarthritis: new insights in animal models. *Open Orthop J*, 2012. 6: p. 558-63.

Little, C.B., et Smith, M.M., Animal Models of Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reviews*, 2008. 4: p. 000-000.

Liu, Y., et al., Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest*, 2012. 122(9): p. 3101-13.

Lee, J.S., et al., Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 1;90(13):6145-9.

Lee, J.A., et al., Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK. *J Biol Chem*, 2005. 280(30): p. 28061-71.

Lin. S.Y., et al., Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(4): p. 1668-75.

Lee, J.E. et Ge, K. Transcriptional and epigenetic regulation of *PPAR γ* expression during adipogenesis. *Cell Biosci*, 2014. 4: p. 29.

M

Maïté, C., Oestradiol et cartilage: données récentes et hypothèse d'action. *Synthèse médecine/ sciences*, 1993. 11(9): p. 1185-91.

Mundermann, A., et al., Secondary gait changes in patients with medial compartment knee osteoarthritis: increased load at the ankle, knee, and hip during walking. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(9): p. 2835-44.

Manidakis, N., et al., Tibial plateau fractures: functional outcome and incidence of osteoarthritis in 125 cases. *Int Orthop*, 2010. 34(4): p. 565-70

Michael, J.W., et al., The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Dtsch Arztebl Int*, 2010. 107(9): p. 152-62.

Mobasheri, A., Role of chondrocyte death and hypocellularity in ageing human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. *Med Hypotheses*, 2002. 58(3): p. 193-7.

Maillefert, J.F., et al., Sex differences in hip osteoarthritis: results of a longitudinal study in 508 patients. *Ann Rheum Dis*, 2003. 62(10): p. 931-934. Muraki, S., et al., Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011. 19(11): p. 1301-6.

McAlindon, T.E., et al., Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann Intern Med*, 1996. 125(5): p. 353-9.

- McAlindon, T.E., et al., Do antioxidant micronutrients protect against the development and progression of knee osteoarthritis? *Arthritis Rheum*, 1996. 39(4): p. 648-56.
- Murray, C.J., et al., Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012. 380(9859): p. 2197-223.
- March, L.M., et Bachmeier, C.J., Economics of osteoarthritis: a global perspective. *Baillieres Clin Rheumatol*, 1997. 11(4): p. 817-34
- Martel, S., et Steensma, C., Les années de vie corrigées de l'incapacité : un indicateur pour évaluer le fardeau de la maladie au Québec. Institut national de santé publique du Québec, 2012. p.32.
- Myers, E.R., et al., A continuum theory and an experiment for the ion-induced swelling behavior of articular cartilage. *Biomech Eng*, 1984. 106(2): p. 151-8.
- McKibbin, B., et Holdsworth, F.W., The nutrition of immature joint cartilage in the lamb. *J Bone Joint Surg Br*, 1966. 48(4): p. 793-803.
- Maroudas, A., et al., Permeability of Articular Cartilage. *Nature*, 1968. 219: p. 1260 – 1261.
- Makris, E.A., et al., The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials*, 2011. 32(30): p. 7411-31.
- McNicol, D., et Roughley, P.J., Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus. *Biochem J*, 1980. 185(3): p. 705-13.
- Malcolm, D.S., The Normal Synovium. *The Open Rheumatology Journal*, 2011. (Suppl 1:M2): p. 100-106.
- Madry, H., et al., The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2010. 18(4): p. 419-33.
- Milz, S., et Putz, R., Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat*, 1994. 185(Pt 1): p. 103-110.
- Martin, J.A., et Buckwalter, J.A., The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology*, 2000. 37(1-2): p. 129-40.
- Myers, S.L., et al., Prevalence of cartilage shards in synovium and their association with synovitis in patients with early and endstage osteoarthritis. *J Rheumatol*, 1992. 19(8): p. 1247-51.

Myers, S.L., et al., Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*, 1990. 17(12): p. 1662-9.

Messent, E.A., et al., Tibial cancellous bone changes in patients with knee osteoarthritis. A short-term longitudinal study using Fractal Signature Analysis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13(6): p. 463-70.

Mansell, J.P., et Bailey, A.J., Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest*, 1998. 101(8): p. 1596-603.

Marie, P., Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste, *Med Sci*, 2001. 17(12): p.1252-1259

Martel-Pelletier, J., et al., IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res*, 1998. 47(3): p. 90-100.

Massicotte, F., et al., Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone*, 2006. 38(3): p. 333-41.

Massicotte, F., et al., Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. 10(6): p. 491-500.

Martel-Pelletier, J., et al., Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2001. 15(5): 805-29.

Massova, I., et al., Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J*, 1998. 12(12): p. 1075-95.

Nagase, H., Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, 1997. 378(3-4): p. 151-60.

Mitchell, P.G., et al., Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 1996. 97(3): p. 761-768.

Murphy, G., et al., Stromelysin is an activator of procollagenase: A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J*, 1987. 248: p. 265-268

Malfait, A.M., et al., Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *Biol Chem*, 2002. 277(25): p. 22201-8.

- Majumdar, M.K., et al., Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(11): p. 3670-4.
- Martel-Pelletier, J., et al., Plasmin, plasminogen activators and inhibitor in human osteoarthritic cartilage. *Rheumatol*, 1991. 18(12): P. 1863-71.
- Mochan, E., et Keler, T., Plasmin degradation of cartilage proteoglycan. *Biochim Biophys Acta*, 1984. 800(3): p. 312-5.
- Morko, J.P., et al., Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2004. 63(6): p. 649-55.
- Maciewicz, R.A., et al., Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS Lett*, 1990. 69(1): p. 189-193.
- Martel-Pelletier, J., et al., Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. *J Orthop Res*, 1990. 8(3): p. 336-44.
- Martel-Pelletier, J., et al., Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2008. 22(2): p. 351-84.
- Merrihew, C., et al., Alterations in endogenous osteogenic protein-1 with degeneration of human articular cartilage. *J Orthop Res*, 2003. 21(5): p. 899-907.
- Middleton, J.F., et Tyler J.A., Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis*, 1992. 51(4): p. 440-447.
- Mueller, M.B., et Tuan R.S., Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM R*, 2011. 3(6 Suppl 1): S3-11.
- Moore, E. E., et al., Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13(7): p. 623-31.
- Martel-Pelletier, 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 Rheum*, 1992. 35(5): p. 530-40.

- Ma, Y., et al., Altered susceptibility to collagen-induced arthritis in transgenic mice with aberrant expression of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(10): p. 1798-805
- Moo, V., et al., Regulation of expression of cytokines and growth factors in osteoarthritic cartilage explants. *Clin Rheumatol*, 2001. 20(5): p. 353-8.
- Martel-Pelletier, J., et al., Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci*, 1999. 4: D694-703.
- 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.
- Murata, T., et al., Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*, 1997. 388(6643): p. 678-82.
- Martin, H., Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat Res*, 2009. 669(1-2): p. 1-7.
- Mbalaviele, G., et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem*, 2000. 275(19): p. 14388-93.
- Matheny, C., et Milbrand, J. The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain. *J Biol Chem*, 1994. 269(11): p. 8176-81.
- Manente A.G., et al., Coordinated Sumoylation and Ubiquitination Modulate EGF Induced EGR1 Expression and Stability. *PLoS One*, 2011. 6(10): e25676.
- Moore, S.K., et al., STR/ort mice, a model for spontaneous osteoarthritis, exhibit elevated levels of both local and systemic inflammatory markers. *Comp Med*, 2011. 61(4): p. 346-55.
- Mason, R.M., et al., The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. 9(2): p. 85-91.
- Marshall, K.W., et Chan, A.D., Arthroscopic anterior cruciate ligament transection induces canine osteoarthritis. *J Rheumatol*, 1996. 23(2): p. 338-43.
- Myers, S.L., et al., Synovitis and osteoarthritic changes in canine articular cartilage after anterior cruciate ligament transection. Effect of surgical hemostasis. *Arthritis Rheum*, 1990. 33(9): p. 1406-15.
- Moulin, D., et al., Rosiglitazone induces interleukin-1 receptor antagonist in interleukin-1beta-stimulated rat synovial fibroblasts via a peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta-dependent mechanism. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(3): p. 759-69.

Miyagi, M., et al., Activator protein-1 mediates shear stress-induced prostaglandin d synthase gene expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(5): p. 970-5.

McNulty, M.A., et al., Histopathology of naturally occurring and surgically induced osteoarthritis in mice. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012. 20(8): p. 949-56.

Mapp, P.I., et al., Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(1): p. 61-9.

Moulin, D., et al., Effect of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma agonists on prostaglandins cascade in joint cells. *Biorheology*, 2006. 43(3-4): p. 561-75.

Murata, Y., et al., Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain. *J Biol Chem*, 1994. 269(32): p. 20674-20681.

Majello, B., et al., Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J Biol Chem*, 1997. 272(7): p. 4021-6.

Melchiorri, C., et al., Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(12): p. 2165-74.

N

Nevitt, M.C., et al., Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.*, 2002. 46(7): p. 1773-9.

Nevitt, M.C., et al., Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med.*, 1996. 156(18): p. 2073-80.

Nakata, K., et al., Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*, 2001. (391 Suppl): S. 208-18.

Nagase, H., et Visse, R., Triple Helicase Activity and the Structural Basis of Collagenolysis. *Extracellular Matrix Degradation, Biology of Extracellular Matrix*, 2011. 2: p. 95-122

Nagase, H., et Kashiwagi, M., Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther*, 2003. 5(2): p. 94-103.

Narazaki, M., et al., Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood*, 1993. 82(4): p. 1120-6.

Naraba, H., et al., Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E2 synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem*, 2002. 277(32): p. 28601-8.

Nakahata, N., Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol. The*, 2008. 118(1): p. 18-35.

O

Oliveria, S.A., et al., Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum*, 1995. 38(8): p. 1134-41.

Oliveria, S.A. et al., Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Epidemiology*, 1999. 10(2): p. 161-6.

Øiestad, B.E., et al., Knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury: a systematic review. *Am J Sports Med*, 2009. 37(7): p. 1434-43.

O'Connor, B.L., The mechanoreceptor innervation of the posterior attachments of the lateral meniscus of the dog knee joint. *J Anat*, 1984; 138 (Pt 1): p. 15-26.

Ohuchi, E., et al., Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*, 1997. 272(4): p. 2446-51.

Orito, K., et al., Fibroblast growth factor 2 in synovial fluid from an osteoarthritic knee with cartilage regeneration. *J Orthop Sci*, 2003. 8(3): p. 294-300.

O'Neill, L.A., et Greene, C., Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol*, 1998. 63(6): p. 650-7.

Olee, T., et al., IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol*, 1999. 162(2): p. 1096-100.

Otsuka, S., et al., PGE2 signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. 17(4): p. 529-38.

Ogawa, Y., et al., Structural organization and chromosomal assignment of the human prostacyclin receptor gene. *Genomics*, 1995. 27(1): P. 142-8.

O'Donovan, K.J., et al., The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci*, 1999. 22(4): p. 167-73.

Okamoto, H., et al., Inhibition of NF-kappaB signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 2005. 23(3): p. 323-30.

Otsuki, S., et al., Extracellular sulfatases support cartilage homeostasis by regulating BMP and FGF signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(22): p. 10202-7.

P

Poole, P., et al., Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61(2): p. ii78-ii81.

Powers, C.J., et al., Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*, 2000. 7(3): p. 165-97.

Pertersson, I.F., et al., Osteoarthritis of peripheral joints. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2002. 16(5): p. 741-60.

Pesesse, L., et al., Osteochondral plate angiogenesis: a new treatment target in osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 2011. 78(2): p. 144-9.

Pitsillides, A.A., et Beier, F., Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol*, 2011. 7(11): p. 654-63.

Panula, H.E., et al., Subchondral bone remodeling increases in early experimental osteoarthrosis in young beagle dogs. *Acta Orthop Scand*, 1998. 69(6):627-32.

Patel, V., et al., MicroCT evaluation of normal and osteoarthritic bone structure in human knee specimens. *J Orthop Res*, 2003. 21(1): p. 6-13.

Pelletier, J.P., et al., The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone*, 2004. 34(3): p. 527-38.

Paredes, Y., et al., Study of the role of leukotriene B(4) in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(7): p. 1804-12.

Porter, S., et al., The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J*, 2005. 386(Pt 1): p. 15-27.

- Palmer, G., et al., Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. *Arthritis Res*, 2002. 4(3): p. 226-31.
- Patel, I.R., et al., TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. *J Immunol*, 1998. 160(9): p. 4570-9.
- Porée, B., 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. *J Biol Chem*, 2008. 283(8): p. 4850-65.
- Palmer, R.M., et al., Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988. 333(6174): p. 664-6.
- Pelletier, J.P., et al., Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(7): p. 1275-86.
- Pelletier, J.P., et al., The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage*, 1996. 4(1): p. 77-84.
- Panigrahy, D., et al., Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. 29(4): p. 723-35.
- Pettipher, R., et al. Antagonism of the prostaglandin D2 receptors DP1 and CRTH2 as an approach to treat allergic diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. 6(4): p. 313-25.
- Pettipher, R., The roles of the prostaglandin D2 receptors DP1 and CRTH2 in promoting allergic responses. *Br J Pharmacol*, 2008. 153(Suppl 1): S191-S199.
- Peters, J.M., et al., Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*, 2000. 20(14): p. 5119-28.
- Pazin, M.J., et Kadonaga, J.T., What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell*, 1997. 89(3): p. 325-8.
- Pagel, J.I., et Deindl, E., Early growth response 1--a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian J Biochem Biophys*, 2011. 48(4): p. 226-35.
- Pritzker, K.P., Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. *Ann Rheum Dis*, 1994. 53(6): p. 406-420.

Pelletier, J.P., et al., Collagenolytic activity and collagen matrix breakdown of the articular cartilage in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1983. 26(7): p. 866-74

Pond, M.J. et Nuki, G., Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis*, 1973. 32(4): p. 387-8.

Palmoski, M.J, et Brandt, K.D., Immobilization of the knee prevents osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum*, 1982. 25(10): p. 1201-8.

Poleni, P.E., et al., Agonists of peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) alpha, beta/delta or gamma reduce transforming growth factor (TGF)-beta-induced proteoglycans' production in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. 15(5): p. 493-505.

Poleni, P.E., et al., Activation of PPARs α , β/δ , and γ Impairs TGF- β 1-Induced Collagens' Production and Modulates the TIMP-1/MMPs Balance in Three-Dimensional Cultured Chondrocytes. *PPAR Res*, 2010. 2010: 635912.

Parakati., R., et DiMario J.X., Dynamic transcriptional regulatory complexes, including E2F4, p107, p130, and Sp1, control fibroblast growth factor receptor 1 gene expression during myogenesis. *J Biol Chem*, 2005. 280(22): p. 21284-94.

Q

Quasnichka, H.L., et al., Subchondral bone and ligament changes precede cartilage degradation in guinea pig osteoarthritis. *Biorheology*, 2006. 43(3-4): p. 389-97.

R

Rosignoll, M., et al., Primary osteoarthritis of hip, knee, and hand in relation to occupational exposure. *Occup Environ Med*, 2005. 62(11): p. 772-777.

Roman-Blas, J.A., et al., Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(5): p. 241.

Roos, H., et al., The prevalence of gonarthrosis and its relation to meniscectomy in former soccer players. *Am J Sports Med*, 1994. 22(2): p. 219-22.

Rumian, A.P., Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features--a comparative study in an ovine model. *J Orthop Res*, 2007. 25(4): p. 458-64.

Rothwell, A.G., et Bentley, G., Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage. *J Bone Joint Surg Brit*, 1973. 55: p. 588–594.

Revell, P.A., et al., The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis*, 1988. 47(4): p. 300–307.

Rollin, R., et al., Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatol Int*, 2008. 28(8): p. 757-64.

Radin, E.L., et al., Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum*, 1970. 13(4): p. 400-5.

Rogers, J., et al., Is osteoarthritis a systemic disorder of bone? *Arthritis Rheum*, 2004. 50(2): p. 452-7.

Ruettger, A., et al., Cathepsins B, K, and L are regulated by a defined collagen type II peptide via activation of classical protein kinase C and p38 MAP kinase in articular chondrocytes. *J Biol Chem*, 2008. 283(2): p. 1043-51.

Roughley, P.J., et Barrett, A.J. The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Proteoglycan structure and its susceptibility to proteolysis. *Biochem J*, 1977. 167(3): p. 629-37.

Redini, F., et al., Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett*, 1988. 234(1): p. 172-6.

Refini, F., et al., Transforming growth factor b exerts cultured rabbit articular chondrocytes through reduction of opposite effects from interleukin-1b on interleukin-1receptor expression. *Arthritis and Rheumatism*, 1993. 36(1): p. 44-50.

Raichel, L., et al., Reduction of cPLA2alpha overexpression: an efficient anti-inflammatory therapy for collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*, 2008. 38(10): p. 2905-15.

Ricciotti, E., et Fitzgerald, G.A. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. 31(5): p. 986–1000.

Robinson D.R., et al., Prostaglandin-stimulated bone resorption by rheumatoid synovia. A possible mechanism for bone destruction in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 1975, 56(5): p. 1181-1188.

Ross, C., et al., A comparison of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: diagnosis and treatment. *Nurse Pract.* 1997. 22(9): p. 20-23. Rossi, A., et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature*, 2000. 403(6765): p. 103-8.

Ricote, M., et Glass, C.K., PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(8): p. 926-935.

Russo, M.W1., et al., Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(15): p. 6873-7.

Ricote, M., et al., The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 1998. 391(6662): p. 79-82.

S

Steultjens, M. P. M., et al., Range of joint motion and disability in patients with osteoarthritis of the knee or hip. *Rheumatology*, 2000. 39 (9): p. 955-961.

Sokolove, J., et Lepus, C.M., Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2013. 5(2): p. 77-94.

Shangha, O., Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology*, 2000. 30(2): p. 3-12.

Swärd, P., et al., Differences in the radiological characteristics between post-traumatic and non-traumatic knee osteoarthritis. *Scan J Med Sci Sports*, 2010. 20(5): p. 731-9.

Sowers, M., et al., Radiographically defined osteoarthritis of the hand and knee in young and middle-aged African American and Caucasian women. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(2): p. 69-77.

Shane, A., et Richard F., L., Why is Osteoarthritis an Age-Related Disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2012. 24(1): p.15.

Srikanth, V.K., et al., A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13(9): p. 769-81.

Su, HI., Freeman, E.W., Hormone changes associated with the menopausal transition. *Minerva Ginecol*, 2009. 61(6): p. 483-9.

Sniekers, Y.H., et al., Oestrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 2010. 12(5): R182.

Spector, T.D., et al., Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ*, 1996. 312(7036): p. 940-3.

Spector, T.D., et MacGregor, A.J., Risk factors for osteoarthritis: genetics. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004. 12(Suppl A): p. S39-44.

Shin, M.H., et al., Étude d'association entre les gènes GDF5 et ADAM12 et l'OA du genou. *Revue du rhumatisme*, 2012. 79(5): p. 432-435.

Soligard, T., et al., Comprehensive warm-up programme to prevent injuries in young female footballers: cluster randomised controlled trial. *BMJ*, 2008. 337: a2469.

Sinusas, K., Osteoarthritis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*, 2012. 85(1): p. 49-56.

Sophia Fox, A .J., et al., The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 2009. 1(6): p. 461-8.

Scott, P.G., et al., Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1336(2): p. 254-62.

Smith M.D., Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis*. 2003. 62(4): p. 303-7.

Schneider, N., Le rôle des synoviocytes dans l'articulation diarthroïdale enflammée. *Ann Méd Vét*, 2007, 151: p. 24-43.

Stephens, M., et al., Human articular surface chondrocytes initiate alkaline phosphatase and type X collagen synthesis in suspension culture. *J Cell Sci*, 1992. 103 (Pt 4): p. 1111-6.

Setton, L.A., et al., Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. 7(1): p. 2-14.

Sniekers, Y.H., et al., A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models. *BMC Musculoskelet Disord*, 2008. 9: p. 20.

Su, S., et al., Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheumatol Int*, 1999. 18(5-6): p. 183-91.

Sandy, J.D., et al., 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*, 1992. 89(5): p. 1512-6.

Stanton, H., et al., Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1812(12): p. 1616-29.

- Song, R.H., et al., Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(2): p. 575-85.
- Serni, U., Plasminogen activator and receptor in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*, 1995. 43: p. 120-2.
- Sawaji, Y., et al., Fibroblast growth factor 2 inhibits induction of aggrecanase activity in human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(11): p. 3498-509.
- Simpson, R.J., et al., Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci*, 1997. 6(5):929-55.
- Silacci, P., et al., Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. *J Biol Chem*, 1998. 273(22): p. 13625-9.
- Schuerwegh, A.J., et al., Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003. 11(9): p. 681-7.
- Sakurai, H., et al., Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest*, 1995. 96(5): p. 2357-63.
- Stadler, J., et al., Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol*, 1991. 147(11): p. 3915-20.
- Sasaki, K., et al., Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem*, 1998. 123(3): p. 431-9.
- Sala, A., et al., Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacol Rep*, 2010. 62(3): p. 503-10.
- Schwab, J.M., et al., COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003. 69(5): p. 339-43.
- Silverman, E.S., et Collins, T., Pathways of Egr-1-Mediated Gene Transcription in Vascular Biology. *Am J Pathol*, 1999. 154(3): p. 665-670.
- Smith, W.L., et al., Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 1996. 271(52): p. 33157-60.

- Spencer, A.G., et al., Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem*, 1998. 273(16): p. 9886-93.
- Sanuki, R., et al., Compressive force induces osteoclast differentiation via prostaglandin E(2) production in MC3T3-E1 cells. *Connect Tissue Res*, 2010. 51(2): p. 150-8.
- Straus, D.S., et al., 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *PNAS*, 2000. 97(9): p. 4844-4849.
- Stitham, J., et al., Prostacyclin: An Inflammatory Paradox. *Front Pharmacol*, 2011. 2: p. 24.
- Sugimoto, Y., et al., Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J Biol Chem*, 1994. 269(2): p. 1356-60.
- Saito, O., et al., Expression of the prostaglandin F receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. 284(6): F1164-70.
- Sugimoto, Y. et al., Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science*, 1997. 277(5326): p. 681-3.
- Sher, T., et al., cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, 1993. 32(21): p. 5598-604.
- Sundvold, H., et al., Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 287(2): p. 383-90.
- Spencer, T.E., et al., Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 1997. 389(6647): p. 194-8.
- Sakamoto, K.M., et al., 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene*, 1991. 6(5): p. 867-71.
- Silverman, E.S., et al., Pathways of Egr-1-Mediated Gene Transcription in Vascular Biology. *Am J Pathol*, 1999. 154(3): p. 665-670.
- Svaren, J., et al., NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(7): p. 3545-3553.
- Srinivasan, R., NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem*, 2006. 281(22): p. 15129-37.
- Stevens, P., et al., Recombinant human protease nexin-1 prevents articular cartilage-degradation in the rabbit. *Agents Actions Suppl*, 1993. 39: p. 173-7.

Setoguchi, K., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J Clin Invest*, 2001. 108(11): p. 1667-75.

Still, K., et al., The peroxisome proliferator activator receptor alpha/delta agonists linoleic acid and bezafibrate upregulate osteoblast differentiation and induce periosteal bone formation in vivo. *Calcif Tissue Int*, 2008. 83(4): p. 285-92.

Scholtyssek, C., et al., PPAR β/δ governs Wnt signaling and bone turnover. *Nat Med*, 2013. 19(5): p. 608-13.

Suske, G., The Sp-family of transcription factors. *Gene*. 1999. 238(2): p. 291-300.

Srivastava, S., et al., Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest*, 1998. 102(10): p. 1850-9.

Shin, Y., et al., Transcription factor Egr-1 is essential for maximal matrix metalloproteinase-9 transcription by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cancer Res*, 2010. 8(4): p. 507-19.

Srivastava, S., et al., Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest*, 1998. 102(10): p. 1850-9.

T

Tey, I.K., et al., Stress fracture of the distal tibia secondary to severe knee osteoarthritis: a case report. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 2006. 14(2): p. 212-5.

Tepper, S., et 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(10): p. 1081-8.

Tsezou, A., et al., The growth differentiation factor 5 (GDF5) core promoter polymorphism is not associated with knee osteoarthritis in the Greek population. *J Orthop Res*, 2008. 26(1): p. 136-40.

Takeda, H., et al., Prevention and management of knee osteoarthritis and knee cartilage injury in sports. *Br J Sports Med*, 2011. 45(4): p. 304-9.

Turner, A., et al., Long term health impact of playing professional football in the United Kingdom. *Br J Sports Med*, 2000. 34(5): p. 332-336.

- Tang, L.H., et al., Effect of link protein concentration on articular cartilage proteoglycan aggregation. *J Orthop Res*, 1996. 14(2): p. 334-9.
- Tim, J.L., et al., The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskeletal Disorder*, 2006. 7: p. 52.
- Toppets, V., et al., Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann. Méd. Vét*, 2004. 148: p 1-13.
- Tortorella, M.D., et al., The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. 9(6): p. 539-52.
- Thornberry, N.A., et al., A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*, 1992. 356(6372): p. 768-74.
- Taskiran, D., et al., Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 200(1): p. 142-8.
- Tai, N., et al., Cytosolic phospholipase A2 alpha inhibitor, pyrroxyphene, displays anti-arthritic and anti-bone destructive action in a murine arthritis model. *Inflamm Res*, 2010. 59(1): p. 53-62.
- Tanabe, T., et Tohnai, N., Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. 68-69: p. 95-114.
- Tanikawa, N., et al., Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 291(4): p. 884-9.
- Toyota, T., et Ueno, Y., Clinical effect and side effect of troglitazone. *Nihon Rinsho*, 2000. 58(2): p. 376-82.
- Tugwood, J.D. et al., The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J*, 1992, 11(2): p. 433-9.
- Thiel, G., et Cibelli, G., Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol*, 2002. 193(3):287-92.
- Tan, L., et al., Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta. *J Biol Chem*, 2003. 278(20): p. 17688-700.

Tardif, G., et al., Cloning, sequencing and characterization of the 5'-flanking region of the human collagenase-3 gene. *Biochem J*, 1997. 323: p. 13–16.

Taylor, B.S., et al., Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 1998. 273(24): p. 15148-56.

Tan, L., et al., Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta. *J Biol Chem*, 2003. 278(20): p. 17688-700.

Tan, N.Y., et Khachigian L.M., Sp1 Phosphorylation and Its Regulation of Gene Transcription. *Mol. Cell. Biol*, 2009. 29(10): p. 2483-2488

Tatarowicz, W.A., et al., Repression of the HSV-1 latency-associated transcript (LAT) promoter by the early growth response (EGR) proteins: involvement of a binding site immediately downstream of the TATA box. *J Neurovirol*, 1997. 3(3): p. 212-24.

Trabandt, A., et al., Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol Int*, 1992. 12(2): p. 53-9.

U

Uitterlinden, A.G., et al., Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J Clin Invest*, 1997. 100(2): p. 259-63.

Uitterlinden, A.G., et al., A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 1996.11(9): p. 1241-8.

Ushiyama, T., et al., Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis. *J Rheumatol*, 1998. 25(1): p. 134-7.

Uitterlinden, A.G., et al., Adjacent genes, for COL2A1 and the vitamin D receptor, are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(7): p. 1456-64.

Uozumi, N., et al., Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *Nature*, 1997. 390(6660): p. 618-22.

Urade, Y., et al., The major source of endogenous prostaglandin D2 production is likely antigen-presenting cells. Localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *J Immunol*, 1989. 143(9): p. 2982-9.

Urade, Y. et Hayaishi, O., Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam Horm*, 2000. 58: p. 89-120.

Urade, Y., et Hayaishi, O., Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1482(1-2): p. 259-71.

Ijpenberg, A., et al., Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem*, 1997. 272(32): p. 20108-17.

Urade, Y., et Eguchi, N., Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. 68-69: p. 375-82.

V

Vasheghani, F., et al., Adult cartilage-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout mice exhibit the spontaneous osteoarthritis phenotype. *Am J Pathol*, 2013. 182(4): p. 1099-106.

Von Mühlen, D., Postmenopausal estrogen and increased risk of clinical osteoarthritis at the hip, hand, and knee in older women. *J Womens Health Gend Based Med*, 2002. 11(6): p. 511-8.

Vos, T., et al., Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012. 380(9859): p. 2163-96.

Verdonk, P.C., et al., Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13(7): p. 548-60.

Van der Kraan, P.M., et van den Berg, W.B., Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage*, 2012. 20(3): p. 223-32.

Von der Mark, K., et al., Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, 1992. 35(7): p. 806-11.

Verma, P., et Dalal, K., ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem*, 2011. 112(12): p. 3507-14.

Van Beuningen, H.M., et al., Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest*, 1994. 71(2): p. 279-90.

Van der Kraan, P.M., et al., Early elevation of transforming growth factor-beta, decorin, and biglycan mRNA levels during cartilage matrix restoration after mild proteoglycan depletion. *J Rheumatol*, 1997. 24(3): p. 543-9.

Van Beuningen, H.M., et al., Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998. 6(5): p. 306-17.

Vincenti, M.P., et Brinckerhoff, C.E., Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res*, 2002. 4(3): p. 157-64.

Van de Loo, F.A., et al., Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. A study in interleukin-6-deficient mice. *Am J Pathol*, 1997. 151(1): p. 177-91.

Vuolteenaho, K., et al., The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*, 2007. 36(4): p. 247-58.

VanRenterghem, B., et al., Regulation of mitogen-activated protein kinase activation by protein kinases A and C in a cell-free system. *J Biol Chem*, 1994. 269(40): p. 24666-72.

Vanden Heuvel ,J.P., Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr*, 1999. 129(2S Suppl): p. 575S-580S.

Van Beuningen, H.M., et al., In vivo effects of interleukin-1 on articular cartilage. Prolongation of proteoglycan metabolic disturbances in old mice. *Arthritis Rheum*, 1991. 34(5): p. 606-15.

Visco, D.M., et al., Experimental osteoarthritis in dogs: a comparison of the Pond-Nuki and medial arthrotomy methods. *Osteoarthritis Cartilage*, 1996. 4(1): p. 9-22.

Van Eekeren, I.C., et al., Fibrates as therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis? A systematic review. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2013. 5(1): p. 33-44.

W

Wang, Y., et al., Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2013. 21(8): p. 1751-62.

Wang, C.T., et al., Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am*, 2004. 86-A(3): p. 538-45.

Wang, B., et al., Phosphorylation and acetylation of histone H3 and autoregulation by early growth response 1 mediate interleukin 1beta induction of early growth response 1 transcription. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(3): p. 536-45.

Williams, J.A., et Thonar, E.J., Early osteophyte formation after chemically induced articular cartilage injury. *Am J Sports Med*, 1989. 17(1): p. 7-15.

Wu, J.J., et al., Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. *J Biol Chem*, 1991. 266(9): p. 5625-8.

Woessner, J.F. Jr., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 1991. 5(8): p. 2145-54.

Welgus, H.G, et al., The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *J Biol Chem*, 1981. 256(18): p. 9511-5.

Wang, J. et al., 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(5): p. 1281-91.

Weng, T., et al., Genetic inhibition of fibroblast growth factor receptor 1 in knee cartilage attenuates the degeneration of articular cartilage in adult mice. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(12): p. 3982-92.

Wei, J., et al., Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ : A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis. *Open Rheumatol J*, 2012. 6: p.103-15.

Westacott, C.I., et al., Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. *J Rheumatol*, 1994. 21(9): p. 1710-5.

Wojdasiewicz, P., et al., The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, 2014. p. 19.

Walch, L., et al., Prostanoid receptors involved in the relaxation of human pulmonary vessels. *Br J Pharmacol*, 1999. 126(4): p. 859-66.

Whittle, B.J., et al., Platelet and cardiovascular activity of the hydantoin BW245C, a potent prostaglandin analogue. *Prostaglandins*, 1983. 25(2): p. 205-23.

Wang, T., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006. 58(1): p. 1-14.

Willson, T.M., et al., The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*, 2000. 43(4): p. 527-50.

Weiss, K., et al., Effect of synthetic ligands of PPAR α , β/δ , γ , RAR, RXR and LXR on the fatty acid composition of phospholipids in mice. *Lipids*. 2011. 46(11): p. 1013-20.

[551] Walton, M., Degenerative joint disease in the mouse knee; histological observations. *J Pathol*, 1977. 123(2): p. 109-22.

Watters, J.W1., et al., Inverse relationship between matrix remodeling and lipid metabolism during osteoarthritis progression in the STR/Ort mouse. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(9): p. 2999-3009.

Wei, L., et al., Comparison of differential biomarkers of osteoarthritis with and without posttraumatic injury in the Hartley guinea pig model. *J Orthop Res*, 2010. 28(7): p. 900-6.

Wierstra, I., Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008. 372(1): p. 1-13.

Wang, F.L., et al., Differential expression of egr-1 in osteoarthritic compared to normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. 8(3): p. 161-9.

X

Xue, L., 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(10): p. 6531-6.

Xu, H.E., et al., Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*, 1999. 3(3): p. 397-403.

Y

Yuqing, Z., et al., Prevalence of Symptomatic Hand Osteoarthritis and Its Impact on Functional Status among the Elderly. The Framingham Study. *American Journal of Epidemiology*, 2002. 156(11): p. 1021-7.

Yoshida, S., et al., Comparison of the prevalence of radiographic osteoarthritis of the knee and hand between Japan and the United States. *J Rheumatol*, 2002. 29(7): p. 1454-8.

Yan, D., et al., Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 2011. 13(4): R130.

Yoshikawa, T., et al., Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPAR δ), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*, 1996. 35(3): p. 637-8.

Yoon, M., The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions. *Pharmacol Res*, 2009. 60(3): p. 151-9.

Yamasaki, S., et al., Functional changes in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated signalling pathway. *Clin Exp Immunol*, 2002. 129(2): p. 379-84.

Yang, S.Z., et Abdulkadir, S.A., Early growth response gene 1 modulates androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2003. 278(41): p. 39906-11

Yun, Z., et al., Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell*, 2002. 2(3): p. 331-41.

Yu et al., Coactivating Factors p300 and CBP Are Transcriptionally Crossregulated by Egr1 in Prostate Cells, Leading to Divergent Responses. *Molecular Cell*, 2004. 15(1): p. 83-94.

Z

Ziskoven, C., et al., Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthop Rev (Pavia)*, 2010. 2(2): e23.

Zhang, Y., et al., Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(9): p. 2065-71.

Zhang, Y., et al., Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(10): p. 1867-73.

Zhang, L., et al., The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng*, 2009. 37(1-2): p. 1-57.

Zhang, W., et al., OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: Part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010. 18(4): p. 476-499.

Zhang, W., et al., OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(2): p. 137-62.

Zamli, Z., et Sharif, M., Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *Int J Rheum Dis*, 2011. 14(2): p. 159-66.

Zysset, P.K., et al., Morphology-mechanical property relations in trabecular bone of the osteoarthritic proximal tibia. *J Arthroplasty.*, 1994. 9(2): p. 203-16.

Zayed, N., et al., Inhibition of interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinases 1 and 13 production in human osteoarthritic chondrocytes by prostaglandin D2. *Arthritis Rheum.* 2008. 58(11): p. 3530-40.

Zandbergen, F., et Plutzky, J., PPAR α in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(8): p. 972-982.

Zhu, Y., et al., Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *Biol Chem*, 1997. 272(41): p. 25500-6.

Zayed, N., et al., Valproic acid suppresses interleukin-1 β -induced microsomal prostaglandin E2 synthase-1 expression in chondrocytes through upregulation of NAB1. *J Rheumatol*, 2011. 38(3): p. 492-502.

Zayed, N., et al., Increased expression of lipocalin-type prostaglandin D2 synthase in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther*, 2008. 10(6): R146.

Zhang, B., et al., Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol*, 1996. 10(11): p. 1457-66.

Zhang, Y., et Dufau, M.L., Silencing of transcription of the human luteinizing hormone receptor gene by histone deacetylase-mSin3A complex. *J Biol Chem.* 2002. 277(36): p. 33431-8.

Zhang, P., et al., Egr-1 mediates hypoxia-inducible transcription of the NDRG1 gene through an overlapping Egr-1/Sp1 binding site in the promoter. *Cancer Res*, 2007. 67(19): p. 9125-33.

Zhang, F., et al., Specific interaction of Egr1 and c/EBPbeta leads to the transcriptional activation of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*, 2003. 278(45): p. 44246-54.