

2 m 110 30 96.6

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MÉTABOLISME OSSEUX ET POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DU  
TENIDAP DANS LA PRÉVENTION DE L'OSTÉOLYSE  
PÉRIPROSTHÉTIQUE

PATRICK LAVIGNE

DÉPARTEMENT DE SCIENCES BIOMÉDICALES  
FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE  
MAÎTRISE ÈS SCIENCES (M.SC.)  
(SCIENCES BIOMÉDICALES)

MARS 2003

©Patrick Lavigne, 2003



W

4

U58

2003

v.149

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

**FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES**

**Ce mémoire intitulé :**

**MÉTABOLISME OSSEUX ET POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DU TENIDAP  
DANS LA PRÉVENTION DE L'OSTÉOLYSE PÉRIPROSTHÉTIQUE**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Dr. HAMDY Reggie, MD, PhD, Président rapporteur**

**Dr. FERNANDES Julio C., MD, M.Sc., Membre du jury et directeur de recherche**

**Dr. REBOUL Pascal, PhD, Membre du jury**

**À Marie-Josée et Xavier,**

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tout d'abord mon directeur de recherche, le Dr Fernandes pour m'avoir encouragé à réaliser ce projet et pour m'avoir soutenu et appuyé dans mes démarches auprès du programme d'orthopédie. Merci pour tout.

À toute l'équipe du laboratoire, Karin et Fatiha pour m'avoir accueilli parmi vous. À Qin Shi pour ton aide technique sans quoi ce projet n'aurait pu se réaliser. À toute l'équipe de l'unité de recherche en arthrose pour leur disponibilité et leurs conseils.

Je tiens aussi à remercier tous les chirurgiens qui ont pris le temps de prélever et d'envoyer au laboratoire des spécimens osseux essentiels pour nos projets. C'est un geste très apprécié.

Merci particulier à Stefan Parent qui a non seulement ouvert de multiples portes pour la recherche au département d'orthopédie mais qui a aussi pris le temps de me guider dans la paperasse administrative et de me conseiller sur le cheminement à suivre. Au plaisir de travailler à nouveau ensemble dans le futur Stefan.

Merci au FRSQ pour son support financier durant la réalisation de ce projet.

À mes parents et mes frères qui m'ont toujours dit que je pouvais faire ce que je voulais dans la vie et qui m'ont appris très tôt de ne jamais lâcher pour atteindre mes objectifs.

Finalement, merci à toi Marie-Josée, pour ta grande patience et ton support inconditionnel dans tous mes projets. Tu m'as suivi et appuyé sans conditions ces dernières années même si mon horaire était débordé et tu m'as donné le plus beau cadeau du monde en Xavier. À toi aussi Xavier mon petit clown. Toi seul sais me faire rire comme tu le fais. Je vous aimerai toujours.

## RÉSUMÉ

L'arthrose (OA) est une maladie incapacitante et irréversible qui touche les articulations d'une grande portion de la population de plus de 50 ans. Elle se manifeste par des douleurs articulaires et une diminution progressive de la fonction secondaire à la perte du cartilage articulaire, aux changements de la synoviale et de l'os sous-chondral. Le traitement de première ligne de l'OA vise à réduire les symptômes par l'administration de médicaments anti-inflammatoires et analgésiques. Malheureusement, le traitement devient de moins en moins efficace à mesure que la maladie progresse et le remplacement articulaire devient alors la seule alternative pour ces personnes.

Les techniques d'arthroplastie, quoique très efficaces dans les premières années, ont une durée de vie utile limitée à une vingtaine d'années. La cause principale d'échec des arthroplasties est le phénomène d'ostéolyse périprothétique. Ce phénomène conduit au déscellement de l'implant, donc à la récurrence des douleurs et à la diminution de la fonction articulaire. Au total, environ 30% des patients opérés pour une arthroplastie primaire seront affectés par ce processus, soit plus de 80 000 personnes annuellement aux Etats-Unis seulement. La chirurgie de révision étant plus difficile, la durée de vie de l'implant plus courte et les résultats fonctionnels moindres qu'une prothèse primaire, prévenir ou empêcher la progression de l'ostéolyse péri implant permettrait aux patients qui en sont atteints de maintenir une fonction de base meilleure et de diminuer le nombre de chirurgies de révision ainsi que la morbidité qui y est associée. Socialement, ceci se

traduirait par une diminution de l'absentéisme et par des économies substantielles en soins de santé vu le coût important des implants orthopédiques.

Le but de ce projet est donc double. Nous allons utiliser le modèle clinique du déscollement aseptique d'une prothèse de hanche et nous allons décrire dans un premier temps les changements métaboliques *in vitro* des ostéoblastes (Ob) humains lorsque soumis à un stress inflammatoire compatible avec celui retrouvé chez des patients souffrant d'ostéolyse périprothétique au niveau de la hanche. Plus particulièrement, nous voulons décrire l'effet du ciment utilisé pour l'ancrage des implants sur les Ob *in vitro* et comparer cet effet à d'autres médiateurs impliqués dans la résorption osseuse du déscollement de prothèse hanche. Ensuite, nous allons comparer l'efficacité *in vitro* de deux agents pharmacologiques dans l'inhibition de la réponse inflammatoire sur des explants de membrane provenant de patients subissant une chirurgie pour un déscollement de prothèse de hanche secondaire à l'ostéolyse. Ces deux médicaments sont le Tenidap, un inhibiteur de cytokines, et le Diclofenac, utilisé entre autre comme anti-inflammatoire de première ligne et dans le soulagement des douleurs musculosquelettiques.

Dans un premier temps, de l'os trabéculaire de la métaphyse proximale du fémur de neuf patients (n=9) subissant l'implantation d'une prothèse primaire de hanche a été prélevé aux zones de Gruen I et VII (zones osseuses situées à la région proximale d'ancrage de part et d'autre de la prothèse) et les Ob extraits ont été mis en culture. Les Ob ont ensuite été stimulés par des médiateurs inflammatoires retrouvés dans le

processus d'ostéolyse, soit les interleukines 1 et 6 (IL-1 et IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ). Le polyméthylmétacrylate (PMMA), un ciment utilisé pour l'ancrage de l'implant à l'os, a aussi été employé pour stimuler les cellules. Le profil métabolique des Ob a été décrit en dosant la production par technique ELISA des marqueurs métaboliques de formation osseuse des Ob, soit la phosphatase alcaline (ALPase) et l'ostéoprotégérine (OPG), ainsi que la production de marqueurs de résorption osseuse, soit IL-6, la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et le facteur de stimulation des macrophages (M-CSF).

L'analyse de l'effet de la stimulation sur le profil métabolique des Ob montre que le PMMA a un effet direct et important sur la cellule en diminuant la production de médiateurs de formation osseuse et en accroissant la production des médiateurs de résorption osseuse. Son effet est comparable à celui de TNF- $\alpha$  reconnu comme la cytokine principale dans le phénomène d'ostéolyse. Par contre, IL-6 et à un degré moindre IL-1, ont un effet moindre sur les médiateurs de résorption osseuse. Nous avons également mis en évidence la présence deux sous-groupes d'Ob selon leur capacité à produire IL-6 et PGE<sub>2</sub>. Bien que la signification de cette découverte reste à être éclaircie, nous croyons que les individus produisant fortement ces deux médiateurs ont une propension plus grande à souffrir d'ostéolyse précoce de par leur capacité plus grande à recruter les ostéoclastes.

Dans un second temps, des explants de membranes recouvrant l'implant déscellé provenant de 20 patients (n=20) subissant une chirurgie de révision de prothèse de

hanche secondaire au processus d'ostéolyse ont été prélevés et incubés en présence de Tenidap et/ou de Diclofenac, deux médicaments anti-inflammatoires, et la production de IL-6, de IL-1, de PGE2 et de TNF- $\alpha$  dosée par ELISA. L'incubation des explants avec le Tenidap a montré une inhibition significative des cytokines et prostaglandines alors que le Diclofenac inhibe seulement la voie des prostaglandines.

Dans cette étude, nous avons évalué le profil métabolique des Ob humains dans un contexte d'ostéolyse périprothétique à la hanche. Plus particulièrement, nous avons éclairci l'importance relative du PMMA dans ce processus par son action double et important sur l'Ob. Nous sommes la première équipe à montrer cette action sur des Ob humain. Nous avons également démontré le potentiel du Tenidap pour retarder la progression de l'ostéolyse par son inhibition combinée des prostaglandines et des cytokines. Nous sommes également la première équipe à démontrer cette action dans ce contexte.

Nous croyons donc qu'à la lumière des résultats de cette étude, la longévité des implants pourrait être accrue par la modulation médicamenteuse de la réponse inflammatoire et par un mode d'ancrage implant/os de meilleure qualité.

## SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is a debilitating and irreversible disease affecting the joints of a great proportion of the population aged over 50 years old and causing pain and a diminution of function secondary to articular cartilage loss, inflammation of the synovium and change in subchondral bone. Currently, the first line of treatment consists of symptomatic treatment of pain with anti-inflammatory and analgesic drugs. Unfortunately, as the disease progresses, the efficacy of medication becomes less and the only remaining option for those patients is articular replacement.

Arthroplasty, although adequately relieving pain and allowing a gain in mobility in the first years after implantation, usually don't last for a lifetime. The survivorship of a prosthesis is limited to about twenty years depending on the articulation operated because of periprosthetic osteolysis causing aseptic loosening of the implant, therefore recurrence of pain and limited function. Close to 30% of patients operated for a primary prosthesis will undergo a second operation to change the implant because of osteolysis, representing more than 80 000 patients annually in the US alone. Unfortunately, a revision surgery is technically more difficult, the results are poorer in terms of function and pain control and the survivorship of the implant less. Slowing the osteolysis process or stopping it would translate into less morbidity for the patient, better functional outcome, less days away from work and lower health care costs.

The aim of this study is double. First, using a clinical model of primary hip prosthesis, we will look at the global changes in metabolic activity of human osteoblasts of OA patients in an *in vitro* simulation of the inflammatory microenvironment found in hip prosthesis loosening. Here, we want to describe the effect of cement used in implant/bone anchoring on the human Ob *in vitro* and compare its effect with that of different inflammatory mediators implicated in implant loosening around the hip. Second, we will evaluate the role of pharmacological agents in the inhibition of inflammatory mediators production in explants of the interface membranes from failed total hip replacements (fTHR). Those two drugs are Tenidap, a cytokine inhibitor and Diclofenac, an anti-inflammatory drug used in relieving musculoskeletal pain.

In the first part, proximal metaphyseal trabecular bone from femur (Gruen zones I and VII) of nine patients (n=9) undergoing primary hip replacement was taken and Ob extracted in culture. We then incubated the Ob sequentially with inflammatory mediators known to be implicated in aseptic loosening, namely interleukins 1 and 6 (IL-1 and IL-6) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). The Ob were also stimulated with polymethylmethacrylate (PMMA), a cement used to anchor the implant to bone. Once stimulated, the metabolic activity of the cell was evaluated for bone formation and bone resorption marker production in the supernatant by an ELISA technique. These markers are alkaline phosphatase (ALPase) and osteoprotegerin (OPG) for bone formation and IL-6, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) for bone resorption.

The results indicate that PMMA has a direct and important effect on the Ob inhibiting the release of bone formation markers and increasing the production of bone resorption mediators, an effect similar to TNF- $\alpha$ , the major mediator in implant loosening. On the other hand, IL-6 and to a lesser degree IL-1 only have an effect on the bone resorbing mediators. Furthermore, we demonstrated the presence of 2 different subpopulations of Ob based on their endogenous ability to produce IL-6 and PGE<sub>2</sub>. However, the exact meaning of this discovery remains to be investigated but we believe that patients producing larger amounts of those mediators are prone to rapid loosening because of their high osteoclasts recruiting capacities.

In the second part, twenty explants of membranes (n=20) from fTHR patients were retrieved and the explants incubated in the presence or absence of Tenidap or Diclofenac. The levels of IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  were then measured in the culture medium using ELISA.

The results show significant inhibition of both the cytokines and PGE<sub>2</sub> pathway with Tenidap and only the PGE<sub>2</sub> pathway with Diclofenac incubation.

In this study, we evaluated the metabolic profile of human Ob under conditions similar to those found in aseptic loosening. In particular, we described the major inflammatory potential of PMMA in osteolysis by its dual action increasing bone resorption markers and reducing bone formation markers. We are the first team to demonstrate this important effect on human Ob. Moreover, the ability of Tenidap to

simultaneously suppress the release of proinflammatory cytokines and PGE<sub>2</sub> may help control osteolysis and prevent aseptic loosening. We are also the first team to demonstrate the potential of Tenidap in aseptic loosening prevention.

We therefore believe that modulating the inflammatory response with medication and finding better anchoring of implant to bone could help increase implant longevity and lead the way to treatment of this pathology.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ FRANÇAIS .....	VI
SUMMARY .....	X
TABLES DES MATIÈRES .....	XIV
LISTE DES FIGURES .....	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XVIII
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 2 : ÉTAT DES CONNAISSANCES .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Métabolisme osseux .....</b>	<b>8</b>
2.1.1 Structure de l'os .....	9
2.1.2 Régulation du métabolisme osseux .....	11
2.1.2.1 Vitamine D .....	11
2.1.2.2 PTH .....	12
2.1.2.3 Autres médiateurs de l'homéostasie osseuse.....	13
2.1.3 Régulation de l'activité des ostéoblastes .....	13
2.1.4 Régulation de l'activité des ostéoclastes .....	15
<b>2.2 Décèlement aseptique de prothèse .....</b>	<b>18</b>
2.2.1 Manifestations cliniques .....	19
2.2.2 Facteurs influençant le taux de révision .....	21

2.2.2.1	<i>Principes de dessin de l'implant</i> .....	22
2.2.2.2	<i>Techniques de fixation de l'implant</i> .....	23
2.2.2.3	<i>Types de matériaux utilisés pour l'implant</i> .....	25
2.2.2.4	<i>Risques affectant le taux de révision reliés aux patients</i> ...	26
2.2.3	Génération des débris .....	27
2.2.4	Réponse inflammatoire aux débris .....	31
2.2.4.1	<i>Effet de la grosseur des particules</i> .....	32
2.2.4.2	<i>Effet du type de particule</i> .....	33
2.2.4.3	<i>Effet des débris sur les macrophages</i> .....	33
2.2.4.4	<i>Effet des débris sur les ostéoblastes</i> .....	34
2.2.4.5	<i>Effet des particules sur la production de cytokines</i> <i>par les ostéoblastes</i> .....	35
2.2.4.6	<i>Effet des cytokines produites en réponses aux</i> <i>particules sur les ostéoblastes</i> .....	36
2.3	<b>Diclofenac et Tenidap</b> .....	37
2.3.1	<b>Diclofenac</b> .....	37
2.3.2	<b>Tenidap</b> .....	39
<b>CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....		41
3.1	<b>Culture des ostéoblastes</b> .....	41
3.1.1	<b>Provenance des échantillons</b> .....	41
3.1.2	<b>Préparation des échantillons</b> .....	42
3.1.3	<b>Culture cellulaire</b> .....	43

<b>3.1.4 Conditions de stimulations des ostéoblastes .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1.5 Évaluation de l'activité métabolique des ostéoblastes .....</b>	<b>44</b>
<i>3.1.5.1 Détermination de l'activité cellulaire de l'ALPASE .....</i>	<i>44</i>
<i>3.1.5.2 Détermination de la production de PGE<sub>2</sub> .....</i>	<i>44</i>
<i>3.1.5.3 Détermination de la production de IL-6 et M-CSF .....</i>	<i>45</i>
<i>3.1.5.4 Détermination de la production de OPG .....</i>	<i>45</i>
<b>3.1.6 Analyse statistique .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Culture des explants membranaires .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.1 Provenance des échantillons .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.2 Préparation des échantillons .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.3 Incubation des échantillons .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.4 Inhibition pharmacologique de la production des cytokines par     les explants membranaires avec le Diclofenac et le Tenidap ...</b>	<b>48</b>
<b>3.2.5 Détermination de la production de IL-1, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>     et PGE<sub>2</sub> par les explants membranaires .....</b>	<b>49</b>
<i>3.2.5.1 Détermination de la production de IL-1, IL-6 et         de TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	<i>49</i>
<i>3.2.5.2 Détermination de la production de PGE<sub>2</sub> .....</i>	<i>50</i>
<b>3.2.6 Analyse statistique .....</b>	<b>50</b>
<b>CHAPITRE 4 : RÉSULTATS .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Résumé du premier article .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Résumé du second article .....</b>	<b>80</b>
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>109</b>

<b>CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES .....</b>	<b>115</b>
<b>6.1 Perspectives .....</b>	<b>115</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>117</b>

### LISTE DES FIGURES

Figure 1. Vue d'un fémur séparé dans le plan coronal .....	9
Figure 2. Actions de la parathormone en réponse à la baisse de la calcémie ...	12
Figure 3. Différenciation des cellules souches en ostéoclastes .....	16
Figure 4. Rôle de l'ostéoblaste dans le recrutement de l'ostéoclaste .....	17
Figure 5. Radiographie d'un patient avec déscellement de prothèse de hanche ...	20
Figure 6. Transmission de la force du bassin au fémur .....	22
Figure 7. Modes de production de débris .....	28
Figure 8. Usure de polyéthylène .....	30
Figure 9. Corrosion de la composante de la tête fémorale .....	31
Figure 10. Structure chimique du Diclofenac .....	37
Figure 11. Mécanisme d'action du Diclofenac .....	38
Figure 12. Structure chimique du Tenidap .....	40

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AINS	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens
ALPase	Phosphatase alcaline
BMP	Bone morphogenic proteins
COX	Cyclooxygénase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
fTHR	Failed total hip revision
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1	Interleukine 1
IL-6	Interleukine 6
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
OA	Ostéoarthrose
Ob	Ostéoblaste
OPG	Ostéoprotégérine
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PMMA	Polyméthylmétacrylate
PTH	Parathormone
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kB
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumour necrosis factor $\alpha$

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

L'arthrose affecte une grande partie de la population de plus de 50 ans (30% des patients de 60 ans et plus sont symptomatiques de l'OA à la hanche seulement) (Wilson MG et al, 1990) et ses causes sont multiples. Qu'elle soit secondaire à un problème d'axe mécanique de l'articulation touchée, par une incongruité des surfaces articulaires suite à un trauma, par une chondrolyse secondaire à l'infection ou par des facteurs propres au patient (surplus de poids, surutilisation d'une articulation), le résultat final est le même, c'est-à-dire une dégradation progressive et irréversible du cartilage, une inflammation de la membrane synoviale et des changements dans l'os sous-chondral. Tous ces phénomènes contribuent au processus de douleurs et de diminution de l'amplitude articulaire, tous deux affectant les activités de la vie quotidienne. Le traitement dit conservateur actuellement n'a que des visées de diminution des symptômes sans impact sur la progression naturelle de la maladie (Radin EL, 1989). L'arthroplastie d'une articulation, soit la mise en place d'une prothèse pour remplacer l'articulation malade, constitue le traitement de choix lorsque la douleur et la perte de fonction deviennent trop importantes chez les patients de plus de 60 ans.

Depuis son introduction dans les années 1950, les techniques d'arthroplasties de la hanche se sont développées grâce une variété de matériaux visant à remplacer les articulations. La hanche étant la plus touchée des articulations, c'est à partir de cette articulation que la plupart des nouveaux matériaux se sont développés.

Nous devons à Sir John Charnley, considéré comme le père de l'arthroplastie, l'introduction de la technique de remplacement articulaire cimentée à la hanche qui a servi de base aux techniques actuelles (Charnley J, 1969). Depuis, le remplacement articulaire s'avère une technique efficace pour redonner aux patients fonction et mobilité. De par le monde, le remplacement articulaire est maintenant devenu pratique courante. Autrefois réservée à une minorité de chirurgiens, elle est aujourd'hui pratiquée dans tous les centres et ses indications se sont étendues du patient âgé avec une fonction limitée au patient plus jeune, souvent avant la cinquantaine avec des demandes fonctionnelles élevées. Toutes indications opératoires confondues, 1.3 millions d'arthroplasties sont effectuées chaque année dans le monde (Harris WH, 1995). Aux Etats-Unis et pour la hanche seulement, il s'installe environ 250 000 prothèses annuellement, tandis qu'en Allemagne et en Suède, respectivement 180 000 et 118 000 prothèses de hanche sont implantées chaque année (Gierse H et al, 1992; Malchau H et al, 1993). Ces techniques sont aujourd'hui généralement bien tolérées par le patient et les résultats sont la plupart du temps excellents dans les premières années.

Les prothèses ont une durée de vie limitée soit par l'usure des composantes au niveau des surfaces de frottement ou par le déscollement de l'implant secondaire à une perte osseuse périprothétique. En effet, lorsque les surfaces portantes glissent l'une sur l'autre, une force de friction est produite. Cette force accélère l'usure des composantes et favorise la production de microparticules. Lorsque les composantes sont trop usées, la prothèse perd ses caractéristiques biomécaniques. Aussi, les débris générés sont

phagocytés et déclenchent une réponse inflammatoire menant peu à peu au processus d'ostéolyse tel que discuté en détails plus loin.

Lorsque la perte d'os au pourtour de l'implant est importante, la fixation dans l'os est compromise et une chirurgie de révision devient alors nécessaire, ayant elle un résultat clinique moins bon et une survie plus courte qu'une procédure primaire (Callaghan JJ et al, 1985; Hanssen AD, Rand JA, 1988). Puisque la durée de vie utile d'une prothèse est limitée, beaucoup de jeunes patients qui seraient autrement d'excellents candidats pour une arthroplastie se voient refusés l'opération parce qu'ils devraient subir deux ou trois chirurgies de révision dans leur vie, sans que l'on puisse leur garantir un résultat acceptable.

De l'ostéolyse précoce du temps de Charnley à aujourd'hui, beaucoup d'efforts ont été fait pour améliorer les combinaisons de matériaux utilisées, le dessin de la prothèse, les méthodes de fixation et la technique opératoire dans le but d'accroître la longévité de l'implant. Malgré les nets progrès réalisés en terme de durée de vie utile, le nombre de chirurgies de révision est en constante augmentation vu l'espérance de vie accrue des patients, l'âge de plus en plus précoce d'installation des prothèses, le nombre grandissant de centres pratiquant cette intervention et l'extension des indications opératoires à des patients dont la chirurgie est très complexe. Les données actuelles en Europe et en Amérique indiquent qu'en moyenne selon les pays, 15% des arthroplasties pratiquées sont des chirurgies de révision, nombre en constante augmentation (Espehaug B et al, 1999; Chan TH, 1997). De plus, jusqu'à 20% des patients montrent de l'ostéolyse

radiologiquement à 10 ans au niveau de la hanche (Fender D et al, 1999; Callaghan JJ et al, 1998; Kim YH, 1999). Malheureusement, la plupart des pays industrialisés faisant face à un manque de ressources matérielles dans le domaine de la santé, ce nombre grandissant de chirurgies de révision ne fait qu'ajouter à ce fardeau économique déjà très lourd, d'autant plus qu'il en coûte environ \$20 000 dollars américains selon le pays par chirurgie de révision, la majorité de la facture étant attribuable au coût de l'implant (World Tribology Forum, 2001).

Parallèlement aux efforts réalisés pour améliorer physiquement et biomécaniquement l'implant, les équipes en laboratoire ont tenté par des études *in vitro* d'élucider la pathophysiologie du déscellement de prothèse. Parmi les premières découvertes d'importance furent celles de Harris et al, qui démontra la présence importante de macrophages et d'ostéoclastes dans l'os périprothétique (Harris WH et al, 1976). Vint ensuite la découverte d'une production accrue de PGE<sub>2</sub> et de collagénase par les membranes périprothétiques, avec pour résultante une lyse osseuse *in vitro* (Goldring SR et al, 1983), découverte suivie plusieurs années plus tard par l'identification et la caractérisation des différentes cytokines impliquées dans la réponse cellulaire (Shanbhag AS et al, 1995).

Peu à peu, la théorie voulant que les débris provenant du ciment et des composantes prothétiques interagissent avec les macrophages pour mener à un recrutement massif d'ostéoclastes conduisant à la résorption osseuse au pourtour de l'implant est maintenant largement acceptée. Malheureusement, toutes ces études n'ont

pas permis le développement de nouveaux matériaux « parfaits » ni de médication efficace pour contrer le processus d'ostéolyse.

Par contre, l'activité et l'importance des Ob dans le processus d'ostéolyse ont été beaucoup moins étudiées, tout comme l'importance de l'interaction Ob/macrophages dans la pathophysiologie du déscollement aseptique (Vermes C et al, 2001).

Vu la morbidité importante, le nombre de patients qui présentent de l'ostéolyse, le coût social en absentéisme et les coûts exorbitants en soins de santé, mieux comprendre ce processus permettrait d'assurer une longévité accrue des implants. Les bénéfices de ces recherches se traduisent pour les patients en terme de morbidité moindre, diminution du nombre de chirurgies nécessaires, du nombre de jours d'absence au travail et une réduction notable des coûts en soins de santé.

La première partie de cette étude est dédiée à l'étude du profil métabolique des Ob humains *in vitro* en réponse à une stimulation par des médiateurs inflammatoires retrouvés *in vivo* dans le déscollement aseptique d'une prothèse de hanche. Cette section de l'expérience vise à décrire le comportement cellulaire face au microenvironnement inflammatoire des Ob périprosthétique en situation d'ostéolyse. Plus particulièrement, nous voulons décrire le rôle du ciment utilisé pour l'ancrage de l'implant, le polyméthylmétacrylate (PMMA), sur les cellules humaines et comparer l'importance de son effet par rapport aux cytokines. Peu d'études dans la littérature portant sur l'effet du PMMA sur les Ob humains ont été réalisées jusqu'ici (Zambonin G et al, 1998; Horowitz

SM et al, 1996). Le ciment étant en contact direct avec les cellules osseuses à l'interface os/implant, nous croyons que son rôle dans la réponse inflammatoire a été jusqu'ici sous-estimé et mérite d'être mieux décrit. Ceci pourrait permettre dans le futur l'élaboration de ciment possédant des propriétés inflammatoires *in vivo* supérieures à ce qui se fait présentement.

De plus, en utilisant de l'os provenant de patients souffrant de OA subissant une chirurgie de remplacement articulaire à la hanche, nous sommes en mesure de mieux extrapoler nos analyses *in vitro* de la réponse inflammatoire aux conditions *in vivo* puisque l'os prélevé représente le lit osseux devant recevoir la prothèse. Nous croyons que ce modèle représente plus fidèlement le métabolisme *in vivo* que l'utilisation de lignée cellulaire immortalisée.

Dans la deuxième partie de l'expérience, nous avons utilisé des explants de membranes prélevés à l'interface os/prothèse de patients subissant une chirurgie de révision de prothèse de hanche suite à l'installation du processus ostéolytique. Nous voulions comparer l'efficacité de deux médicaments anti-inflammatoires à inhiber la réponse inflammatoire décrite ci-haut. L'utilisation des membranes permet d'obtenir un milieu cellulaire contenant des macrophages et des ostéoclastes qui sont les effecteurs de la réponse ostéolytique.

L'incubation des explants avec le Diclofenac, un anti-inflammatoire utilisé entre autre dans le traitement des douleurs articulaires et celles dues au déscollement aseptique

de prothèse, ou avec le Tenidap, un médicament expérimental inhibiteur de cytokines, permettra de comparer l'efficacité respective de ces deux médicaments dans l'inhibition de la réponse inflammatoire et la modulation de l'ostéolyse. Vu que les médiateurs inflammatoires produits *in vivo* sont variés et proviennent de différentes cascades métaboliques, un médicament pouvant inhiber plusieurs voies métaboliques simultanément pourrait ainsi diminuer de façon importante la réponse inflammatoire et donc ralentir ou prévenir le processus ostéolytique.

Pour mieux comprendre l'étendue des connaissances concernant la pathophysiologie du déscellement de prothèse de hanche, le chapitre deux présentera l'état des connaissances actuelles sur le sujet. Le chapitre trois présentera la méthodologie utilisée pour réaliser les diverses expériences. Les résultats seront présentés sous forme de deux articles scientifiques au chapitre quatre. Le premier, intitulé «Metabolic activity of osteoblasts retrieved from osteoarthritic patients after stimulation with mediators involved in pepriprosthetic loosening», sera soumis au journal «Journal of Orthopedic Reseach» pour publication. Le second, intitulé «Modulation of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE2 by pharmalogical agents in explants of membranes from failed total hip replacement» est déjà publié dans la revue *Osteoarthritis and Cartilage*, (2002) 10, 898-904. Au chapitre cinq, une discussion générale sera présentée et le chapitre six permettra de conclure avec les perspectives futures dans ce champ de recherche.

## CHAPITRE 2 ÉTAT DES CONNAISSANCES

Ce chapitre se veut un résumé des connaissances actuelles sur le déscollement de prothèse de hanche causé par l'ostéolyse. Dans un premier temps, les processus généraux de régulation de la formation et de la résorption osseuse seront couverts. Ensuite, l'effet *in vivo* du type de matériau utilisé pour l'implant et la génération de débris seront discutés ainsi que la réponse inflammatoire résultante. Finalement, je résumerai les caractéristiques et les mécanismes d'action propres aux agents pharmacologiques utilisés dans cette étude soit le Tenidap et le Diclofenac.

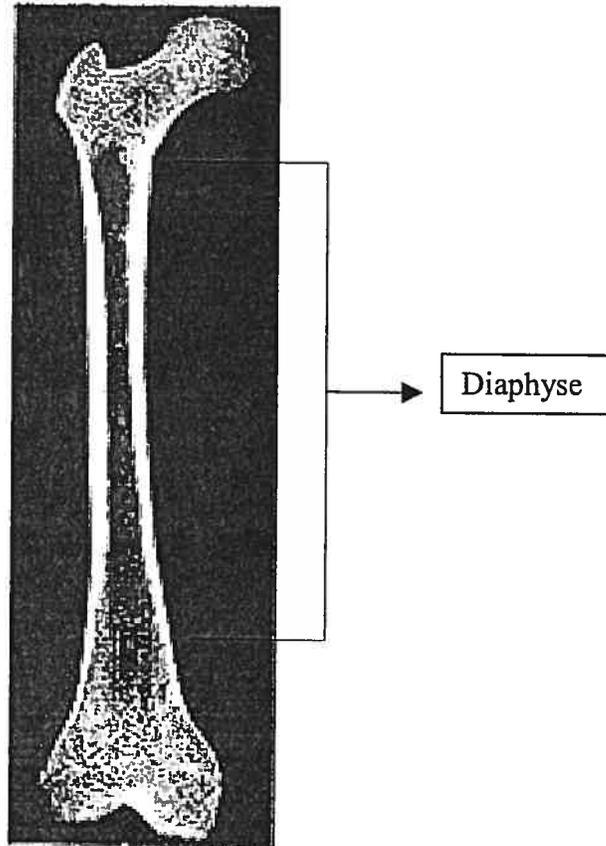
### 2.1 MÉTABOLISME OSSEUX

L'os est un tissu dynamique en perpétuel remaniement. La formation et la résorption osseuse par les cellules de l'os sont étroitement régulées par des médiateurs hormonaux et locaux. L'os est aussi un réservoir à minéraux. L'absorption, l'excrétion et les échanges des minéraux entre le sang et l'os sont aussi soumis à ce contrôle étroit. En plus de permettre la mobilité, l'os a un rôle de soutien et de protection pour divers organes.

La prochaine section discute de la structure de l'os, de son rôle dans l'organisme et du contrôle du métabolisme osseux au niveau systémique mais aussi au niveau cellulaire.

### 2.1.1 Structure de l'os

Le squelette humain est un organe important du corps recevant 10% du débit cardiaque et l'association de matières solides et organiques permet à l'os d'accomplir son rôle particulier de structure et mobilité dans l'organisme. La portion externe de l'os, le cortex, est solide et dense et la portion interne, l'os trabéculaire ou spongieux, est constitué de minces travées osseuses friables (Figure 1).



**Figure 1. Vue d'un fémur séparé dans le plan le coronal.**  
*L'os trabéculaire se retrouve surtout au niveau de l'épiphyse et de la métaphyse aux extrémités de l'os.*  
*L'os cortical est solide, dense et fortement minéralisé. Il se retrouve surtout dans la portion de la diaphyse.*

L'os compact en périphérie présente une structure annulaire concentrique. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les nerfs du périoste traversent l'os par les canaux de Volkmann et rejoignent ensuite ceux de la cavité médullaire. Ces canaux sont connectés aux canaux de Havers, parallèles à l'axe longitudinal de l'os. Les canaux sont entourés de lamelles concentriques dures et calcifiées. Entre les lamelles se trouvent les ostéoblastes, logettes renfermant les ostéocytes. Les ostéocytes sont responsables de l'échange des nutriments au niveau de l'os. Le canal de Havers, la lamelle, l'ostéoblaste et l'ostéocyte forment l'ostéon, unité fonctionnelle de base de l'os. L'os spongieux se trouve au centre de l'os et son réseau de trabécules ressemble à une éponge. C'est entre les trabécules osseuses que l'on retrouve la moelle (Tortora GJ et al, 1988).

L'os est constitué principalement de trois types cellulaires, l'ostéoblaste favorisant la formation osseuse par le dépôt de matrice, l'ostéocyte qui est en fait un Ob cloisonné dans la matrice qui ne produit plus d'os et l'ostéoclaste, responsable de la résorption osseuse. Les cellules ne comptent que pour 2% des composés organiques de l'os et sont imbriquées dans une matrice organique composée à 95% de collagène de type 1, le reste de la matrice étant composée par diverses protéines, dont la majorité viennent à l'os par la circulation sanguine. C'est l'ostéoblaste qui est responsable du dépôt de la matrice organique. Sur cette matrice se joint la portion minérale solide de l'os composée principalement de calcium et de phosphore, mais également de magnésium et de sodium. Les substances organiques (cellules et matrice) comptent pour 30% du poids sec de l'os alors que la portion inorganique représente 70% de ce poids (Harrison TR et al, 1992).

## 2.1.2 Régulation du métabolisme osseux

L'équilibre entre la formation et la résorption de l'os est régulé par l'interaction entre les Ob et les ostéoclastes sous la surveillance étroite des facteurs hormonaux et vitamiques, soit la calcitonine, la parathormone (PTH) et le calcitriol dérivé de la vitamine D. La concentration sérique du calcium et du phosphore, principaux constituants de l'os, est influencée par ces régulateurs (Harrison TR et al, 1992).

### 2.1.2.1 Vitamine D

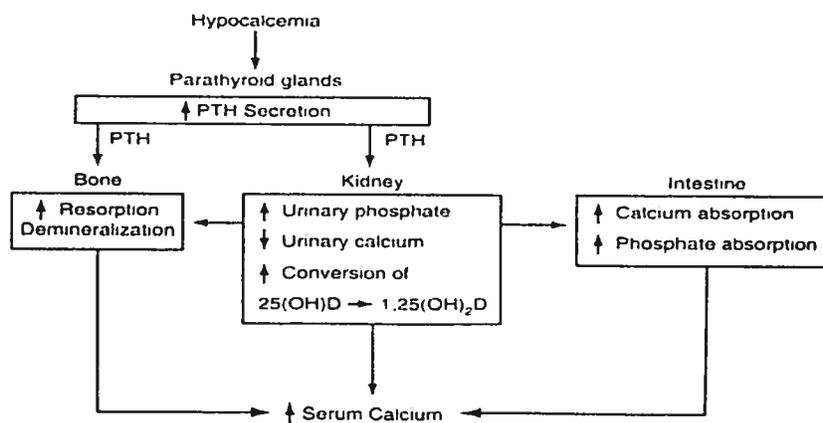
Lorsque le calcium alimentaire est ingéré, il est absorbé dans le tube digestif au niveau du duodénum par transport actif et au jéjunum par transport passif. Environ 20% du calcium alimentaire ingéré atteint la circulation sanguine. Son absorption dépend de la présence d'une protéine de transport qui est exprimé sous le contrôle de la vitamine D.

La vitamine D doit subir plusieurs transformations pour être active. Après une transformation à la peau sous l'action du soleil, le foie et les reins la transforment par le biais de réaction enzymatiques pour obtenir sa forme active, le  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Cette forme active de la vitamine D a aussi un effet direct sur le métabolisme osseux en permettant à la fois le dépôt de matrice par les Ob et le recrutement et la différenciation des monocytes en ostéoclastes sous le contrôle de divers médiateurs locaux (Brown AJ et al, 1999), facilitant ainsi une activité de résorption osseuse. Elle permet également la réabsorption

du phosphore aux reins. Globalement, la vitamine D augmente le calcium et le phosphore sérique.

### 2.1.2.2 PTH

La parathormone, produite au niveau des glandes parathyroïdes, a comme cible le rein, les intestins et l'os. Elle est sécrétée en réponse à une baisse du calcium extracellulaire et augmente donc la concentration sérique de calcium. Ceci se fait par la stimulation de l'activité ostéoclastique dans l'os, la diminution de l'excrétion rénale et l'absorption accrue de calcium dans le tube digestif par son action positive sur les enzymes responsables de la transformation de la vitamine D. Les ostéoclastes n'ont pas de récepteurs à la PTH sur leur surface cellulaire mais elle agit sur l'Ob qui transmet son effet par l'interaction avec les ostéoclastes. La PTH stimule aussi l'expression du « receptor activator of NF-kB ligand » (RANKL) et diminue celle de OPG, avec un effet net de perte de masse osseuse (Aubin JE et al, 2000). Elle diminue aussi la réabsorption de phosphore au niveau du rein. Son action globale est donc une augmentation de la quantité de calcium sérique et une diminution du phosphore sérique (figure 2).



**Figure 2. Actions de la parathormone en réponse à une baisse de la calcémie.**

*La baisse du calcium sérique entraîne dans l'organisme une sécrétion de PTH qui agit sur l'os, le rein et l'intestin pour provoquer une hausse de la calcémie.*

**2.1.2.3 Autres facteurs impliqués dans l'homéostasie osseuse**

D'autres facteurs exercent un effet sur l'os. La calcitonine est produite au niveau des cellules parafolliculaires thyroïdiennes lorsque la concentration sérique de calcium est à la hausse. Elle a les mêmes cibles que la PTH mais à un effet contraire à cette dernière en favorisant la formation osseuse, diminuant l'absorption au niveau du tube digestif et l'excrétion de calcium aux reins. Les estrogènes et les androgènes stimulent la résorption osseuse par des mécanismes non élucidés. Les corticostéroïdes par leur effet d'inhibition général sur la synthèse de protéines peuvent aussi avoir un effet négatif sur l'équilibre osseux de même que les hormones thyroïdiennes qui, bien qu'elles aient un effet stimulant à la fois la formation et la résorption osseuse, entraînent une résorption osseuse nette de par l'effet plus grand sur les ostéoclastes que sur les Ob (Harrison TR, 1992).

**2.1.3 Régulation de l'activité des ostéoblastes**

L'ostéoblaste est la cellule responsable du dépôt de la matrice osseuse et a pour origine des cellules mésenchymateuses. En culture, l'Ob est presque identique aux fibroblastes avec comme seule différence morphologique une matrice extracellulaire

minéralisée. Cependant, la cascade d'événements menant à la différenciation et à la maturation des Ob est très peu décrite par rapport aux ostéoclastes. Tous les gènes codant pour des facteurs de transcription exprimés chez l'Ob le sont aussi chez le fibroblaste exception faite *Cbfa1*, qui est reconnu spécifique aux Ob (Ducy P et al, 1997).

Le mécanisme d'action de *Cbfa1* est mal compris mais son rôle comme facteur de différenciation des Ob ne fait pas de doute. Les études animales avec des souris knock out pour le gène *Cbfa1* montrent que ces animaux naissent avec un squelette mature mais constitué exclusivement de cartilage, sans aucune différenciation des précurseurs en Ob (Komori T et al, 1997; Otto F et al, 1997). De plus, ces souris ne démontrent pas de formation d'ostéoclastes puisque les Ob sont nécessaires dans leur différenciation, comme nous le verrons plus loin. *Cbfa1* est par conséquent clairement impliqué dans la différenciation des Ob mais les facteurs en amont de *Cbfa1* et les effecteurs qu'il engendre sont toujours inconnus, tout comme sa régulation au niveau cellulaire.

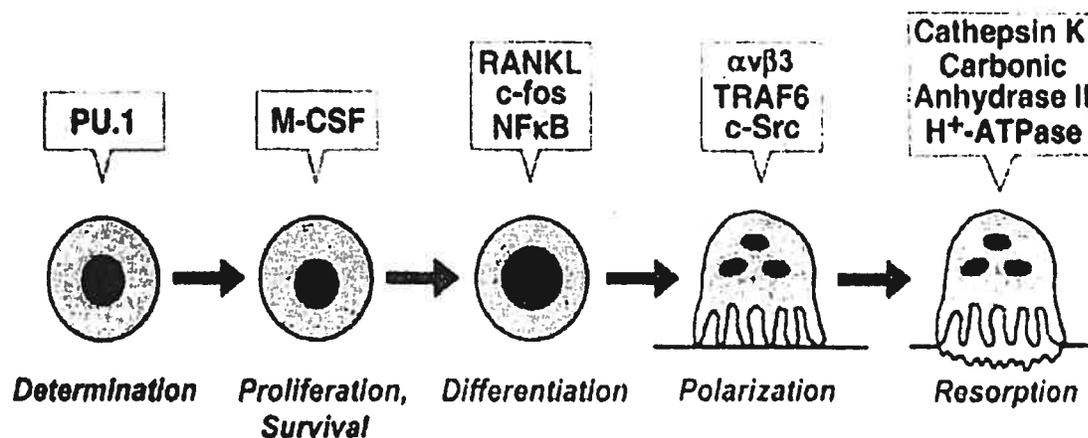
Il est par contre connu que d'autres facteurs de croissance sont impliqués dans le développement embryonnaire des Ob. Les « bone morphogenetic proteins » (BMP) stimulent l'expression *in vitro* de *Cbfa1* (Ducy P et al, 1997) tandis que TGF- $\beta$  le diminue (Pierre JM et al, 2000). Cependant, l'effet *in vivo* n'a pas encore été démontré pas plus que son importance physiologique. Beaucoup d'études sont encore nécessaires pour élucider la différenciation et la maturation des Ob.

Plusieurs cytokines exercent un effet sur les Ob.  $PGE_2$  et  $TNF-\alpha$  ont un effet négatif sur la cellule en inhibant l'expression de l'ARNm du procollagène  $\alpha 1$  résultant en une réduction de la synthèse du collagène de type I (Huddleston HD, 1988).  $TNF-\alpha$  et IL-1 induisent aussi la sécrétion de IL-6, de transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) de M-CSF (Vermes C et al, 2001; Kimble RB et al, 1996), de IL-8 et de monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Fritz EA et al, 2002), ces deux derniers médiateurs étant deux facilitateurs de la réponse inflammatoire. À son tour, IL-6 peut activer les ostéoclastes directement par son récepteur ou indirectement en augmentant l'expression de RANKL (Adebanjo OA et al, 1998; Quinn JM et al, 2000). TGF- $\beta 1$  quant à lui permet de contrer l'effet de perte de la masse osseuse en favorisant la prolifération des ostéoblastes et la synthèse du collagène de type I (Vermes C et al, 2001). M-CSF est essentiel au recrutement des ostéoclastes et son action est décrite plus en détail dans la section suivante.

#### **2.1.4 Régulation de l'activité des ostéoclastes**

L'ostéoclaste est la cellule responsable de la résorption osseuse et est presque exclusivement dédiée à la régulation de la masse osseuse. Un débalancement du métabolisme osseux en faveur des ostéoclastes mène à la perte de la masse osseuse, soit l'ostéoporose, qui peu importe son étiologie, résulte en une instabilité structurale rendant une personne qui en est atteinte plus susceptible aux fractures.

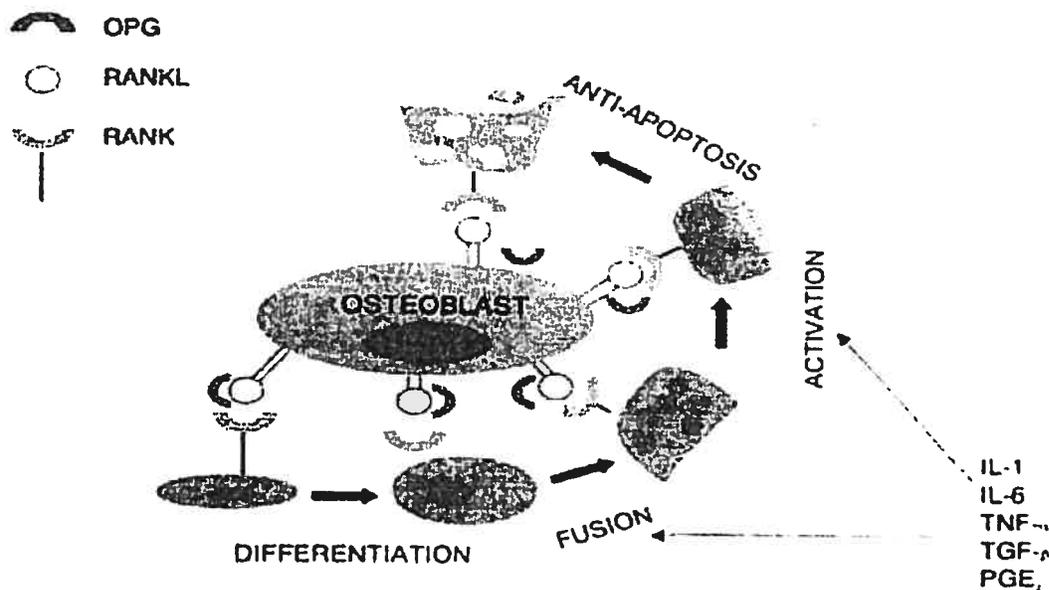
L'ostéoclaste provient de la lignée cellulaire des monocytes/macrophages et la maturation en ostéoclastes nécessite la présence de cellules stromales ou d'ostéoblastes (Udagawa N et al, 1990). La présence de M-CSF et de RANKL (aussi connu sous l'appellation OPGL) est essentielle pour la prolifération, survie et différenciation des précurseurs d'ostéoclastes (Udagawa N et al, 1990). Le M-CSF donne aux précurseurs le signal nécessaire à leur prolifération et survie (Figure 3). Par contre, les précurseurs doivent entrer en contact avec les ostéoblastes ou avec les cellules stromales pour compléter le processus de maturation (Udagawa et al, 1990). Ceci se fait par l'interaction entre RANKL sur les cellules stromales ou les Ob et son récepteur RANK sur les précurseurs d'ostéoclastes. Cette liaison peut être inhibée de façon compétitive par la présence de OPG, qui est un récepteur soluble sécrété par les Ob (Lacey DL et al, 1998).



**Figure 3. Différenciation des cellules souches en ostéoclastes.** *La voie de différenciation des ostéoclastes nécessite le M-CSF pour assurer la prolifération et la survie des cellules tandis que RANKL et NFκB est nécessaire pour la différenciation.*

Les Ob ont donc la double fonction de recrutement des ostéoclastes par l'expression à leur surface de RANKL et d'inhibition de leur maturation par la sécrétion de OPG. C'est l'équilibre entre l'expression de ces deux médiateurs qui dicte la quantité d'os qui est résorbé (Hofbauer LC et al, 1999) (Figure 4).

Les plupart des médiateurs qui stimulent la résorption osseuse tels PTH, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et TNF- $\alpha$  accroissent l'expression de RANKL (Lee SK et al, 1999; Kitazawa R et al, 1999; Merkel KD et al, 1999;). Aussi, TNF- $\alpha$  a un effet positif sur M-CSF, tout comme IL-1 (Kimble RB et al, 1996). Sur des modèles animaux de souris, il a été démontré que M-CSF et RANKL sont essentiels à l'ostéoclastogénèse, puisque l'absence de l'un ou de l'autre empêche chez ces souris le recrutement d'ostéoclastes et provoque l'ostéopétrose (Kong YY et al, 1999; Yoshida H et al, 1995), maladie caractérisée par l'absence de résorption osseuse et donc, par une augmentation de la masse de l'os.



**Figure 4. Rôle de l'ostéoblaste dans le recrutement des ostéoclastes.** *Grâce à l'interaction RANK/RANKL et la production de cytokines (particulièrement M-CSF), l'ostéoblaste est en mesure de recruter les ostéoclastes et d'assurer leur survie.*

Il est maintenant accepté que l'ostéoblaste constitue le pivot central du métabolisme osseux. Il est le responsable de la formation osseuse et régule le recrutement des ostéoclastes.

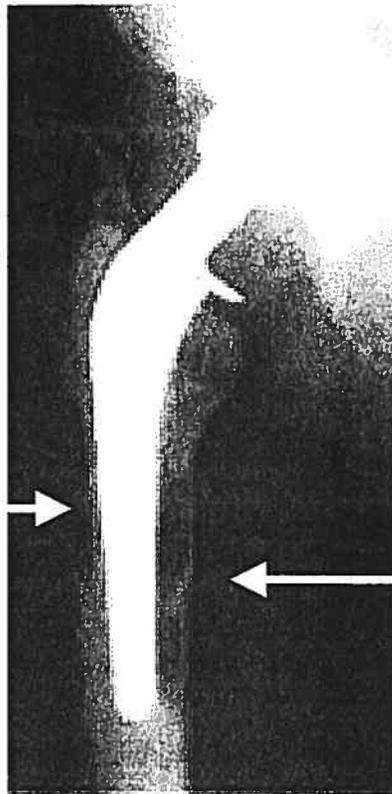
## **2.2 DÉSCÈLLEMENT ASEPTIQUE DE PROTHÈSE**

Depuis le tout début de l'arthroplastie, beaucoup d'efforts ont été faits pour trouver la prothèse idéale. Les principes de base ont grandement évolué ces dernières années et le dessin de l'implant, les méthodes de fixation, les matériaux utilisés et les caractéristiques des patients à risque de déscollement sont maintenant mieux décrits. En ce sens, les études de survie des implants débutées au milieu des années 1990 devraient nous montrer des résultats préliminaires intéressants et ainsi couronner le fruit des efforts de ces dernières années. Par contre, même les nouveaux types de matériaux produisent des débris qui sont considérés comme l'élément déclencheur du processus ostéolytique. Par conséquent et bien que leur charge en particules soit moindre, on doit aussi s'attendre à ce que ces matériaux génèrent une réponse inflammatoire capable d'initier le processus d'ostéolyse.

Dans la section qui suit, je décrirai plus en détails les principes de bases en arthroplastie, les facteurs menant au déscollement d'implants et la réponse inflammatoire aux débris générée à partir des différentes composantes faisant partie d'un implant orthopédique. Je ne discuterai uniquement que de l'articulation de la hanche puisque nous nous sommes servis de ce modèle clinique pour nos recherches et c'est avec de l'os provenant de la tête fémorale que nous avons travaillé dans ce projet. C'est aussi l'articulation qui présente le taux le plus élevé de déscollement de prothèse secondaire à l'ostéolyse. La théorie présentée ici s'applique cependant aux autres articulations soumises au remplacement articulaire.

### **2.2.1 Manifestations cliniques**

Une fois opéré pour un remplacement articulaire, les patients sont en général nettement améliorés et voient leurs fonction de base accrue de façon importante. Certains patients souffriront par contre au fil des ans d'une diminution de la fonction avec leur prothèse. Dans la vaste majorité des cas, ceci sera causé par un phénomène d'ostéolyse autour de l'implant. L'ostéolyse périprothétique peut se présenter cliniquement comme un amincissement cortical ou comme la formation d'un kyste osseux focal soit au niveau de la métaphyse ou de la diaphyse de l'os. L'ostéolyse peut se retrouver à la fois dans les implants cimentés et les non-cimentés. La résultante de cette diminution de la masse osseuse est une perte de fixation de l'implant causant un mouvement de la prothèse dans l'os ce qui produit alors de la douleur chez le patient et une diminution subséquente de la fonction chez ce dernier (Figure 5).



**Figure 5. Radiographie d'un patient avec déscollement de prothèse de hanche.**

*Les flèches représentent les zones d'ostéolyse périprothétique*

Des études ont démontré que des foyers d'ostéolyse périprothétique pouvaient se retrouver chez des patients asymptomatiques avec des implants stables. Maloney a rapporté à 2 ans un taux d'ostéolyse fémoral focal de 3% en révisant les radiographies de 474 patients et Martell, un taux de 8% à 5,5 ans de suivi moyen chez 110 patients (Maloney WJ et al, 1990; Martell JM et al, 1993). Un seul de ces patients présentait des douleurs légères. À un suivi minimum de 8 ans par contre, l'incidence du taux d'ostéolyse était de 14,9% et il augmente à près de 20% à 10 ans (Fender D et al, 1999; Callaghan JJ et al, 1998; Kim YH et al, 1999), démontrant l'augmentation de ce processus avec le temps.

En révisant les caractéristiques démographiques de ces patients, aucune différence n'a pu être observée entre les patients démontrant de l'ostéolyse au pourtour de la composante fémorale et ceux n'en présentant pas, sauf lorsque l'indication opératoire était l'ostéonécrose de la tête fémorale, soit la mort des cellules osseuses suite au manque d'apport sanguin. L'ostéonécrose était plus fréquente chez les patients avec ostéolyse, mais la relation ostéolyse/ostéonécrose est probablement attribuable au fait que cette sous-population de patients a tendance à être plus jeune et plus active, donc plus demandante sur leur articulation produisant de ce fait une usure précoce des composantes, une plus grande génération de débris et donc plus d'ostéolyse (Martell JM et al, 1993).

Il est donc possible, de par les résultats de ces études, de démontrer radiologiquement l'installation d'un processus de déscollement de prothèse avant que le patient ne devienne symptomatique. C'est à ce moment qu'un traitement pouvant ralentir ou cesser le développement de l'ostéolyse pourrait être débuté et ainsi permettre de prolonger la survie de l'implant.

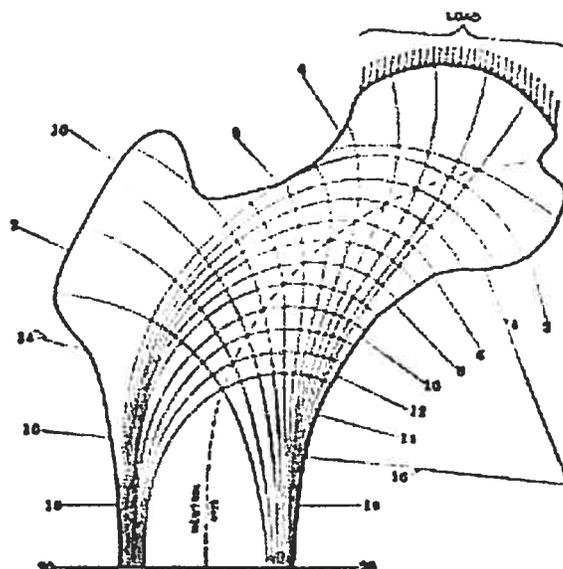
### **2.2.2 Facteurs influençant le taux de révision**

Selon le registre national suédois des prothèses de hanche, 76% des chirurgies de révision sont dues à l'ostéolyse, 8% aux infections, 5% aux fractures, 5% aux luxations et 6% à des causes diverses. Il n'est donc pas surprenant que beaucoup d'efforts aient été faits pour améliorer l'implant et sa fixation à l'os dans les dernières décennies. Au fil des

ans, de nouveaux matériaux ont été utilisés dans la fabrication des implants et le mode de fixation s'est grandement amélioré. La forme de la prothèse a aussi été modifiée pour tenter de prolonger la vie de l'implant.

### 2.2.2.1 Principes de dessin de l'implant

Le dessin de la tige fémorale, les caractéristiques de surface et la technique de fixation déterminent en partie la survie de l'implant. Le dessin de la tige fémorale doit reproduire le plus fidèlement possible la transmission physiologique des forces du bassin au genou à travers le fémur. L'os réagit à cette transmission de force en augmentant la quantité d'os dans les régions où les vecteurs de force sont importants de façon à assurer la solidité de l'os et éviter les fractures. La transmission de la force dans l'os est donc essentielle au maintien de la masse osseuse (Figure 6). Lorsque l'implant absorbe toutes les forces sans les transmettre à l'os, un phénomène appelé « stress-shielding », la masse osseuse diminue alors autour de l'implant.



**Figure 6. Transmission de la force du bassin au fémur.** *En station debout, le poids du corps est transmis de la tête fémorale vers le genou. Les lignes de tension représentent la transmission de la force. Passée la métaphyse, la force est transmise par les cortex de la diaphyse. Plus la concentration de forces est grande, plus l'os se remaniera de façon à assurer une masse osseuse suffisante dans ces régions. Ce mécanisme assure la solidité à l'os.*

Deux aspects sont importants dans ce contexte : maximiser l'aire de contact prothèse/os de façon à distribuer le plus uniformément possible les forces et deuxièmement, la force devrait être transmise au niveau de la région métaphysaire de l'os de façon à éviter la perte osseuse au fémur proximal (Willert HG et al, 1981). Il est difficile par contre de produire la conformation de prothèse optimale puisque l'anatomie du canal fémoral diffère d'un patient à l'autre. Plusieurs types de prothèse sont présentement sur le marché ayant chacune leurs avantages et inconvénients.

#### *2.2.2.2 Techniques de fixation de l'implant*

L'interface os/prothèse réagit à la corrosion et à la génération de débris puisque le tissu de granulation formé par la présence de débris est capable d'activer les ostéoclastes avec la production résultante du processus d'ostéolyse et du déscollement de l'implant par un ancrage déficient. Il existe deux types de fixation présentement : les prothèses cimentées et les non cimentées. Les deux techniques ont pour but d'assurer une fixation empêchant tout mouvement de la prothèse dans l'os.

Les avantages du ciment sont une fixation primaire solide permettant la mise en charge précoce, un taux de douleurs à la cuisse moindre et la diminution des infections par l'ajout au ciment d'antibiotiques. Par contre, la polymérisation du ciment a le désavantage de dégager beaucoup de chaleur provoquant du même coup la nécrose osseuse (Endler F, 1981). Aussi, le solvant utilisé avec le ciment est toxique *in vivo*, le ciment génère une grande quantité de débris et il complique les chirurgies de révision puisque tout le ciment doit alors être retiré du canal avant l'insertion de la prothèse de révision.

La philosophie derrière la technique de fixation sans ciment repose sur une stabilité secondaire, permise suite à la migration des ostéoblastes et la formation subséquente d'os sur et à l'intérieur de l'implant. Une fois attachés à l'implant, les Ob génèrent une matrice osseuse dans la surface poreuse qui recouvre la prothèse ce qui permet alors l'ancrage à l'os. La stabilité initiale primaire est donnée par le « press-fit » de l'implant à l'insertion dans le fémur. L'avantage principal de ce type de fixation réside dans l'absence de ciment (moins de débris, aucun solvant, révision plus facile). Par contre, son désavantage principal provient de l'impossibilité de mise en charge précoce par absence de stabilité primaire (quoi que cette règle est de plus en plus contestée) et un taux de douleur à la cuisse supérieur comparés aux implants cimentés (Effenberger H, 1996).

### 2.2.2.3 Types de matériaux utilisés pour l'implant

Les types de matériaux utilisés ont une influence dans le taux de déscollement des implants. Les matériaux doivent être biocompatibles (non toxiques) et biofonctionnels (permettre une fonction acceptable au patient pendant un temps donné). Les matériaux présentement utilisés sont le métal, les alliages, la céramique et le polyéthylène (Willert et al, 1981). Chacun de ces matériaux a des propriétés qui font qu'ils s'usent de façon plus ou moins rapide générant ainsi des débris. La production de débris est essentielle au processus d'ostéolyse et il est de mise qu'un matériau générant peu de débris ait tendance à minimiser le phénomène d'ostéolyse.

La combinaison la plus utilisée présentement est un implant en métal glissant sur une surface de polyéthylène imbriqué dans l'acétabulum (métal/polyéthylène). Cette combinaison offre un taux d'usure de 0.1 à 0.2 mm par an. Les autres combinaisons ont un taux d'usure moindre : céramique/polyéthylène de 0.05 à 0.13 mm/an, métal/métal de 0.001 à 0.005 mm/an et céramique/céramique de 0.001 à 0.005 mm/an également (Jasty M et al, 1997; Clarke IC et al, 1997; Kurtz SM et al, 1998; Doom PF et al, 1998).

Chacune de ces combinaisons présente des caractéristiques physiques et un coût propres qui influence le chirurgien dans le choix de l'implant à utiliser pour un patient. Entre autre, bien que la céramique semble avoir l'avantage d'un taux d'usure très bas, une telle prothèse à l'inconvénient d'être dispendieuse et des cas de fracture de la tête de céramique ont été rapportés de par la fragilité de la céramique. De son côté, le couple

métal/métal a le désavantage de générer plus de corrosion et donc plus d'ions métalliques dans l'environnement de l'implant. Les nouveaux polyéthylènes sur le marché sont cependant supposés être beaucoup plus résistants à l'usure et ainsi générer ainsi moins de débris mais les données *in vivo* manquent toujours.

#### *2.2.2.4 Risques influençant le taux de révision reliés aux patients*

Le patient lui-même peut influencer le taux de révision. La compliance aux traitements de réhabilitation dans les premières semaines qui suivent la chirurgie sera déterminante pour le succès de l'opération. L'âge du patient aussi est importante. Il est le premier facteur influençant le taux de révision. Un patient plus jeune est plus à risque de désceller vu les demandes accrues qu'il impose à l'implant. Il en est de même pour les hommes comparés aux femmes (Ahnfelt L et al, 1990; Havelin LI et al, 1990). Évidemment, plus un patient est âgé, moins il a de chance de devoir subir une chirurgie de révision avant sa mort, mais la réhabilitation est aussi parfois retardée par des complications post-opératoires plus fréquentes chez les personnes plus âgées. L'âge comme facteur dans le déscellement de prothèse est donc une question de demandes imposées à l'implant, mais aussi une question de santé en général.

Un autre facteur à considérer est la charge mise sur l'implant, soit la combinaison du poids, de l'occupation et du type d'activités récréatives du patient (Dorr LD et al, 1983; Surin VV et al, 1983; White SH, 1988; Hozack et al, 1990). Plus un patient impose une charge élevée sur l'implant, plus il est à risque de désceller. Aussi, les patients

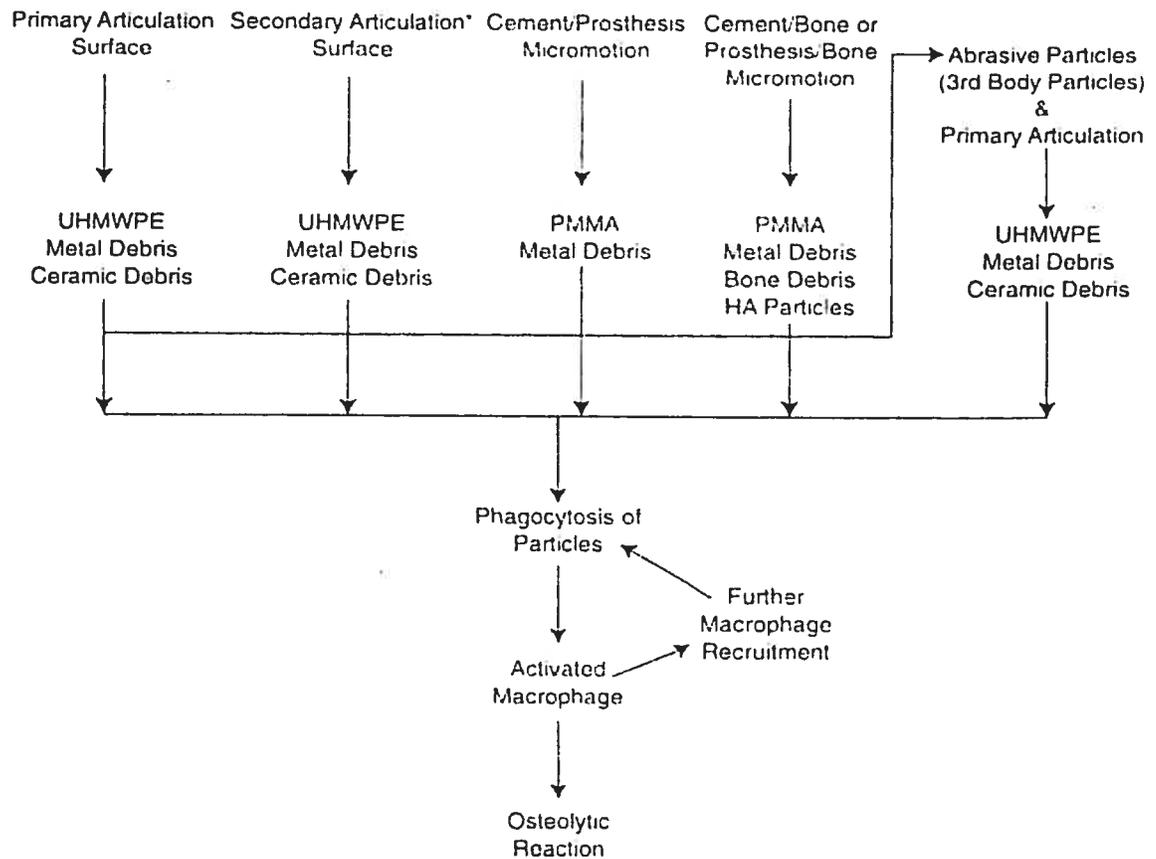
diabétiques (par un risque accru aux infections), ceux consommant la cigarette, l'alcool, une médication anti-inflammatoire ou à base de stéroïdes ou une hormonothérapie de remplacement sont plus à risque de déscellement (Espehaug B et al, 1997).

Le diagnostic est aussi un facteur important à considérer. Les patients atteints d'arthrite rhumatoïde et ceux chez qui une prothèse est implantée pour une fracture du col fémoral ont de moins bons résultats en terme de survie de prothèse que les patients avec OA chez qui un remplacement articulaire est fait (Ahnfelt L et al, 1990; Havelin LI et al, 1990).

### **2.2.3 Génération des débris**

La génération de débris à partir des matériaux utilisés pour fabriquer la prothèse et la réponse inflammatoire de l'hôte face à ces débris est considérée comme l'événement déclencheur du phénomène d'ostéolyse et par conséquent du déscellement aseptique des prothèses articulaires (Goldring SR et al, 1986). Le modèle actuel d'ostéolyse périprothétique stipule que les débris générés sont phagocytés par les macrophages et les ostéoblastes qui initient une réponse inflammatoire menant au recrutement des ostéoclastes et à la résorption osseuse (Figure 7).

## Wear Sources in Joint Replacement



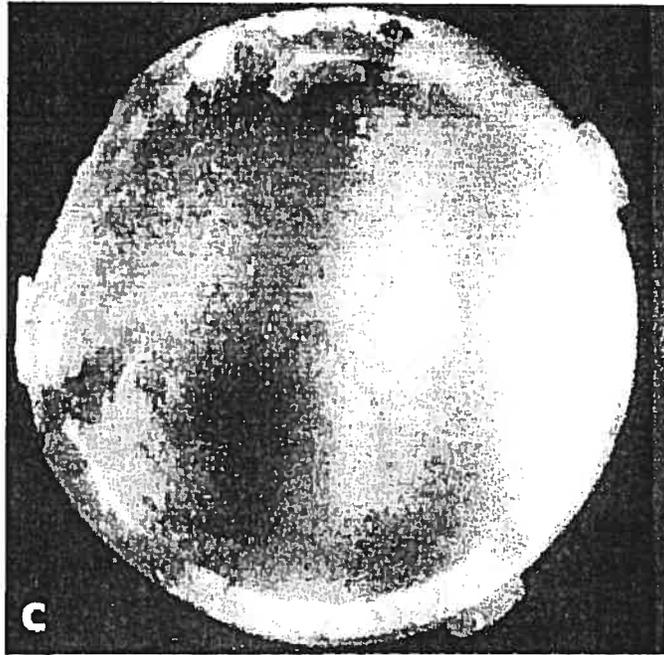
**Figure 7. Modes de production de débris.** Les débris sont générés à partir des surfaces articulaires mais aussi à l'interface prothèse/ciment et os/ciment (ou os/prothèse si non cimentée). Les débris sont ensuite phagocytés et activent macrophages et ostéoblastes entraînant la réaction ostéolytique par la relâche de cytokines et de médiateurs proinflammatoires. (UHMWPE : Ultra high molecular weight polyethylene; HA : Hydroxyapatite)

Plusieurs évidences pointent en faveur de ce mécanisme. Premièrement, jusqu'à  $10^9$  particules par gramme de tissus peuvent être récupérées à partir de la membrane qui se forme à l'interface os/prothèse dans les cas de déscollement aseptique de prothèse

(Margevicius KJ et al, 1994). Deuxièmement, l'ingestion des particules stimule la relâche de cytokines *in vitro* (Blaine TA et al, 1996). Troisièmement, des concentrations élevées de cytokines sont retrouvées dans le liquide articulaire et les tissus entourant un implant déscellé (Horowitz SM et al, 1993; al Saffer N et al, 1994; Kadoya Y et al, 1996). Quatrièmement, le conditionnement des monocytes par des débris stimule la résorption osseuse *in vitro* (Glant TT et al, 1994). Et finalement, sur des modèles animaux, on a mis en évidence une quantité importante de cytokines au pourtour de l'implant lorsque l'ostéolyse était générée par les débris (Schwarz EM et al, 1998; Merkel KD et al, 1999).

L'ostéoblaste aussi est impliqué dans la phagocytose des particules, l'amplification de la réponse inflammatoire, le recrutement des ostéoclastes et des macrophages tel que discuté auparavant.

Les débris retrouvés dans les cas de déscellement de prothèse sont produits de deux façons : l'usure et la corrosion. L'usure est définie comme étant la perte de matériel par l'implant sous forme de particules. Tous les débris générés ont une capacité qui leur est propre à entraîner une réponse inflammatoire comme nous le verrons plus loin. On trouve trois formes d'usure, soit l'abrasion (une surface dure frottant sur une surface plus molle), l'adhésion (une surface molle se collant sur une surface plus dure) et la fatigue (cycles répétés de mise en charge et de décharge provoquant des microfissures dans le matériau) (Schmalzried TP et al, 1999) (Figure 8).



**Figure 8. Usure du polyéthylène.** *Composante de surface acétabulaire en polyéthylène montrant une usure importante.*

La corrosion quant à elle s'applique au processus électrochimique par lequel les ions métalliques sont relâchés de la surface de l'implant, le plus souvent à l'interface métal/métal (Urban R et al, 1994) (Figure 9). Les ions relâchés dans le milieu se trouvent sous forme de sels métalliques solides suite à la précipitation dans le microenvironnement prosthétique. Tout comme les particules non-ioniques des composantes, les ions aussi ont le potentiel de provoquer une réponse inflammatoire selon leurs caractéristiques propres.



**Figure 9.** Corrosion de la composante de tête fémorale. *Le processus de corrosion provoque la génération de sels d'ions ayant soit un effet toxique sur les cellules environnantes ou un effet proinflammatoire.*

#### **2.2.4 Réponse inflammatoire aux débris**

Une fois libérées dans le milieu, les particules sont phagocytées par les macrophages et les Ob. Il s'en suit non seulement un effet global sur la réponse inflammatoire, mais aussi un effet direct sur la prolifération et la survie de la cellule. La réponse inflammatoire de l'hôte ne dépend pas seulement du type de particule, mais aussi de leur grosseur, de leur nombre, de leur concentration et de leur composition.

#### 2.2.4.1 Effet de la grosseur des particules

Les débris les plus souvent retrouvés *in vivo* sont, en ordre d'importance, les particules de polyéthylène (PE), de PMMA, des alliages de cobalt et de titanium. On retrouve aussi, dans des proportions beaucoup moindres, des débris d'acier inoxydable provenant des instruments chirurgicaux. Toutes ces particules peuvent engendrer une réponse inflammatoire *in vivo*. La grosseur des débris de polyéthylène retrouvé est à 90% inférieure à 1  $\mu\text{m}$  (moyenne 0.5  $\mu\text{m}$ ) (Maloney WJ et al, 1995; Margevicius KJ et al, 1994).

Plusieurs études ont démontré l'effet de la grosseur des particules sur la réponse inflammatoire. Horowitz a montré que les particules de PMMA phagocytées par les macrophages (moins de 7  $\mu\text{m}$ ) peuvent engendrer la sécrétion de TNF- $\alpha$  tandis que les grosses particules en sont incapables (Horowitz SM et al, 1993). Données d'ailleurs confirmées par Gelb qui ajoute que PGE<sub>2</sub> et les métalloprotéases sont aussi produites en réponse aux particules de PMMA (Gelb H et al, 1994)

La capacité à phagocyter la particule et donc sa taille est importante puisque les plus grosses particules n'ont pas le même effet sur la cellule. Il semble d'ailleurs que la cytotoxicité augmente chez les macrophages avec la grosseur de la particule alors que les petites particules (< 0.6  $\mu\text{m}$ ) ne sont toxiques qu'à des concentrations très élevées (Catelas I et al, 1998).

#### *2.2.4.2 Effet du type de particule*

Le type de particule a aussi son importance dans la toxicité puisque chaque particule provoque un effet différent. L'acier inoxydable et le cobalt-chrome-molybdène utilisés dans la confection d'implants sont cytotoxiques tandis que le mélange titanium-aluminium-vanadium ne l'est pas (Haynes DR et al, 1998). Par contre, ce dernier mélange induit la production la plus intense de médiateurs inflammatoires (Haynes DR et al, 1998). En général, les particules métalliques sont plus inflammatoires que le polyéthylène (Shanbhag AS et al, 1995; Blaine TA et al, 1997).

Des études de viabilité cellulaire sur les Ob ont aussi été réalisées avec les ions métalliques. Les particules ont été classées de la moins toxique à la plus toxique (sodium < chromium < magnésium < molybdène < aluminium < cobalt < nickel < fer < cuivre < manganèse < vanadium) (Hallab NJ et al, 2002). Les ions les plus toxiques (nickel, fer, cuivre, manganèse, vanadium) étaient aussi les seuls à stimuler la production de IL-6, cytokine importante pour le métabolisme des Ob.

#### *2.2.4.3 Effet des débris sur les macrophages*

En général, bien que la grosseur et la composition des particules soient importantes, on retient que les débris interagissent avec les monocytes/macrophages et génèrent la production dans le milieu périprothétique de TNF- $\alpha$ , IL-1 et de IL-6. Ces cytokines entraînent chez l'ostéoblaste la production de IL-6, de PGE<sub>2</sub> et des

métalloprotéinases (Glant TT et al, 1993; Yao J et al, 1995; Shandbhag AS et al, 1995; Nakashima Y et al, 1998), ainsi que plusieurs autres médiateurs pro-inflammatoires. Ces médiateurs induisent la prolifération et le recrutement des ostéoclastes, favorisant ainsi la résorption osseuse (Jones LC et al, 1987; Glant TT et al, 1993; Dorr LD et al, 1990; Goodman SB et al, 1989; Shandbhag AS et al, 1995).

Le PMMA quant à lui induit chez les macrophages la production de IL-6, TNF- $\alpha$  et il n'exerce aucun effet sur IL-1. Par contre, il est capable de stimuler la résorption osseuse dans un modèle *in vitro* (Trindade MCD et al, 2001; Ingham E et al, 2000).

#### 2.2.4.4 Effet des débris sur les ostéoblastes

Récemment, le rôle central des Ob dans le déscollement de prothèse a été mis de l'avant. Les Ob sont en effet capables de phagocyter les débris. Cette action permet ainsi la relâche de cytokines et de PGE<sub>2</sub>, donc le recrutement d'ostéoclastes et la résorption osseuse (Vermes C et al, 2000; Dean DD et al, 1999). De plus, les ostéoblastes sont essentiels à la différenciation et la maturation des ostéoclastes (Udagawa N et al, 1990). La phagocytose des particules par les Ob cause une suppression de l'expression du gène de procollagène- $\alpha$  1, produisant une diminution de la sécrétion du collagène de type 1 qui constitue à 90% la matrice osseuse (Yao J et al, 1997; Vermes C et al, 2000; Roebuck KA et al, 2001; Vermes C et al, 2001). Tout comme sur les macrophages, les particules métalliques ont le plus d'impact sur les Ob et sur la production du collagène que les polymères (Yao J et al, 1997; Vermes C et al, 2001). La suppression de la prolifération

des Ob est aussi plus importante avec les particules métalliques qu'avec les polymères et cet effet est dose-dépendant (Vermes C et al, 2001).

Le PMMA a aussi un effet suppressif sur la prolifération des Ob. Il inhibe la production de collagène, stimule la production de IL-6 et augmente le ratio OPGL/OPG (favorise le recrutement d'ostéoclastes) (Zambonin G et al, 1998; Granchi D et al, 2002).

#### *2.2.4.5 Effet des particules sur la production de cytokines par les ostéoblastes*

L'interaction des particules avec les Ob résulte en la production accrue de IL-6, IL-8, M-CSF, « Transforming growth factor  $\beta$  1 » (TGF- $\beta$  1) et PGE<sub>2</sub> (Vermes C et al, 2000; Vermes C et al, 2001; Shida J et al, 2000; Takei H et al, 2000; Fritz EA et al, 2001; Dean DD et al, 1999). Chacun de ces médiateurs ont un effet différent sur l'homéostasie osseuse. IL-6 et PGE<sub>2</sub> activent les ostéoclastes de façon paracrine avec pour résultat la résorption osseuse (Jilka RL et al, 1992; Lader CS et al, 1998) tout comme M-CSF, qui recrute les macrophages et donne le signal nécessaire à la différenciation des ostéoclastes (Udagawa N et al, 1990). IL-8 est aussi un facteur de recrutement des neutrophiles capable de stimuler les ostéoclastes (Fritz EA et al, 2001). TGF- $\beta$  1 est aussi produit, probablement dans le but d'accroître la production collagène de type1 (Vermes C et al, 2001). TGF- $\beta$  1 et « Insulin-like growth factor-1 » (IGF-1) sont capables de renverser l'effet suppressif des particules sur la production de collagène par les Ob sans toutefois accroître la production de IL-6 (Vermes C et al, 2001), ce qui constitue une réponse autocrine protectrice pour l'Ob.

#### *2.2.4.6 Effets des cytokines produites en réponse aux débris sur les ostéoblastes*

L'effet des cytokines sur les Ob s'exerce de façon autocrine et paracrine, puisque ces médiateurs sont solubles. L'effet de TNF- $\alpha$  et de PGE<sub>2</sub> sur l'Ob est une suppression de l'expression de l'ARNm du procollagène- $\alpha$  1 (Mauviel A et al, 1994; Grande JP et al, 1997). TNF- $\alpha$  stimule la production de IL-6, IL-8, M-CSF et TGF- $\beta$  par les Ob (Fritz EA et al, 2001; Vermes C et al, 2000; Vermes C et al, 2001; Takei H et al, 2000). La production de IL-6 subséquente peut activer les ostéoclastes (Adebanjo OA et al, 1998) ou augmenter l'expression de RANKL (Quinn JM et al, 2000; O'Brien CA et al, 1999), nécessaire à l'activation des ostéoclastes.

La production de IL-8 et de M-CSF par l'Ob suite à la présence de particules et de cytokines dans le milieu extra cellulaire vient amplifier la réponse inflammatoire puisque ces deux médiateurs sont impliqués dans le recrutement des cellules inflammatoires (Fritz EA et al, 2001; Adebanjo OA et al, 1998).

Tous ces médiateurs sont impliqués dans la réponse inflammatoire aux débris et tous contribuent au processus de déscollement de prothèse. Leurs actions et productions sont intimement liées.

## 2.3. DICLOFENAC ET TENIDAP

### 2.3.1 Diclofenac

Dans cette étude, nous avons utilisé le Diclofenac (Figure 10), un dérivé de l'acide phénylacétique. Les indications d'utilisation de ce médicament comportent toutes les conditions inflammatoires aiguës et chroniques, les conditions douloureuses ainsi que comme antipyrétique pour combattre la fièvre.

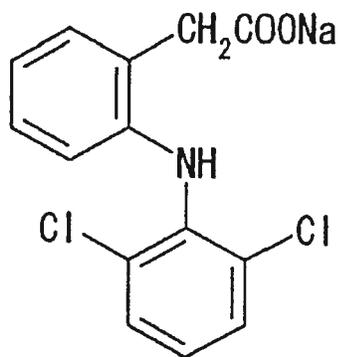
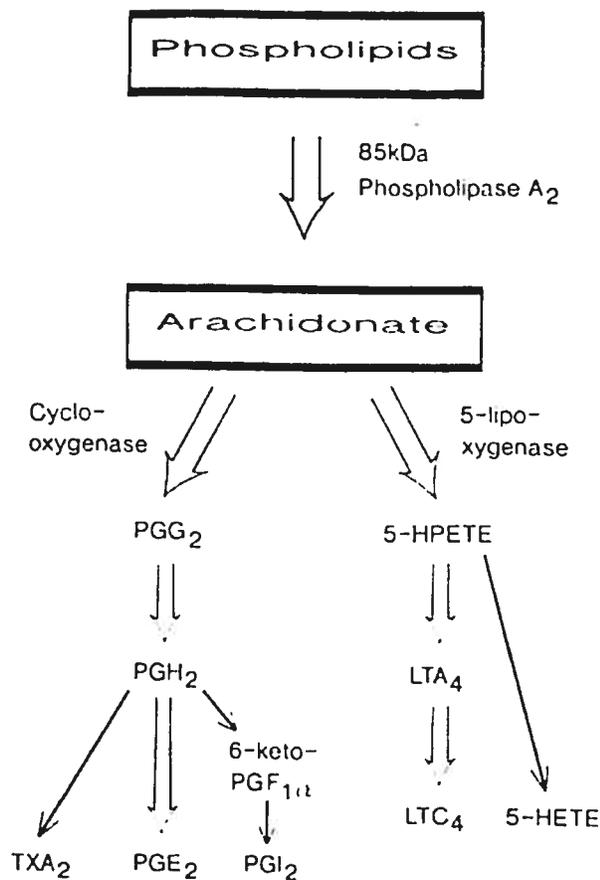


Figure 10. Structure chimique du Diclofenac.

L'effet anti-inflammatoire de ce médicament est relié à l'inhibition de la production des prostaglandines. Il agit sur la cyclooxygénase-1 et 2 (COX-1 et COX-2) pour enrayer la synthèse des prostaglandines (Figure 11), mais aussi des prostacyclines et du thromboxane. Il possède aussi une action contre les neutrophiles, diminuant le chimiotactisme, la production de superoxydes et de protéinases (Todd PA et al, 1988).

Une fois dans l'organisme, le Diclofenac pénètre de façon efficace la synoviale inflammée et le liquide articulaire. Il est métabolisé au foie et y est éliminé. Son profil d'utilisation est sécuritaire et aucun ajustement de dosage n'est nécessaire chez les personnes âgées ni selon la fonction rénale. Environ 12% des patients souffrent d'effets secondaires mineurs et la majorité des malaises sont d'origine gastrointestinaux, suivi de réactions allergiques et locales. Comparé aux autres AINS de la même classe, le Diclofenac a un profil d'effets secondaires nettement avantageux (Todd PA et al, 1988).



**Figure 11. Mécanisme d'action du Diclofenac.** *Le Diclofenac inhibe la COX-1 et COX-2 empêchant la production de prostaglandines et de thromboxanes.*

Dans l'OA, le Diclofenac s'est avéré nettement supérieur au placebo pour réduire les douleurs et augmenter la fonction. Comparé à d'autres AINS pour la même indication, il s'est avéré tout aussi efficace pour soulager les douleurs (Todd PA et al, 1988) musculosquelettiques et articulaires. Néanmoins, il n'y a pas d'effet sur la progression de la maladie.

### **2.3.2. Tenidap**

Le Tenidap (Figure 12) est un médicament de la classe des oxyndoles ayant une double action inhibant à la fois la cyclooxygénase (COX-1 fortement, COX-2 faiblement) et la production de cytokines proinflammatoires comme IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$  (Moore PF et al, 1996; Otterness IG et al, 1989; Sipe JD et al, 1992). Il est aussi capable d'inhiber la collagénase, la sécrétion d'enzymes lysosomales, la génération de superoxydes et il peut abaisser la concentration sérique de plusieurs marqueurs biochimiques de l'activité inflammatoire (Littman BH et al, 1993; Benigni F et al, 1996). Son action contre les cytokines est reliée à sa capacité d'inhibition du transport anionique et l'abaissement subséquent du pH intracellulaire.

Le Tenidap est aisément absorbé par voie orale et est métabolisé au foie, présentant une biodisponibilité totale de 85%. Il est excrété dans l'urine et les selles. Son profil d'effets secondaires est semblable à celui des AINS, puisque 87% des effets secondaires sont relié à des problèmes gastrointestinaux (dyspepsie 14%; douleur

abdominale 12%; diarrhée 6%). Les réactions cutanées locales, la perte de cheveux et les céphalées constituent les autres effets le plus souvent rencontrés.

Les indications pour le Tenidap sont présentement limitées au traitement expérimental de l'arthrite rhumatoïde. Son profil d'utilisation sécuritaire et son action combinée sur la diminution des prostaglandines et des cytokines en font un médicament avec des propriétés très intéressantes pour le traitement de pathologies inflammatoires diverses dont l'ostéolyse périprothétique. Chez le modèle animal d'arthrose, il a présenté un ralentissement significatif de la progression de l'arthrose (Fernandes JC et al, 1998).

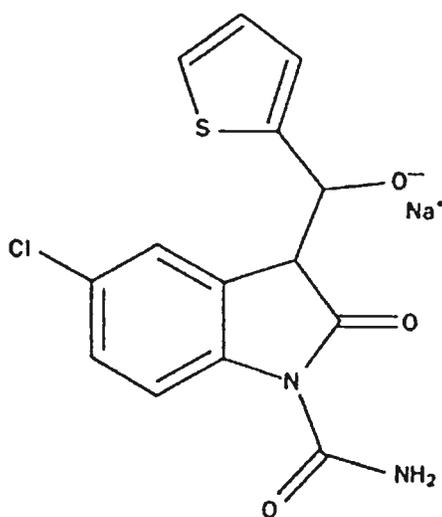


Figure 12. Structure chimique du Tenidap

## **CHAPITRE 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Ce chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser ce projet. La première partie présentera les méthodes de culture cellulaire et de stimulation des cellules par les différents médiateurs employés. La seconde partie sera dédiée aux manipulations effectuées pour la réalisation des études d'inhibition de la production des cytokines par le Tenidap et le Diclofenac.

### **3.1 CULTURE DES OSTÉOBLASTES**

Cette première section correspond à l'expérimentation sur l'étude du profil métabolique des Ob soumis *in vitro* à une stimulation par des médiateurs proinflammatoires retrouvés *in vivo* chez les patients atteints de déscollement aseptique de prothèses de hanche.

#### **3.1.1 Provenance des échantillons**

Les spécimens osseux utilisés proviennent de neuf (n=9) patients opérés pour l'implantation de prothèse de hanche et dont l'indication chirurgicale était l'arthrose. Les hôpitaux ayant fourni des échantillons pour la réalisation de cette étude sont : l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, Sacré-Cœur, St-Luc, Hôtel-Dieu et Notre-Dame.



L'os trabéculaire a été prélevé dans la région métaphysaire (zones I et VII de Gruen) du fémur de ces patients. Le spécimen a ensuite été placé de façon stérile dans une solution Lactate Ringer et acheminé au laboratoire pour préparation.

### 3.1.2 Préparation des échantillons

L'os est coupé en petits morceaux d'environ 2 mm<sup>2</sup> à l'aide d'un bistouri après avoir été nettoyé dans un milieu Ham F12/Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM/F12; Sigma, St. Louis, MO) cinq fois. Chaque lavage comportait un cycle de vortex pour 10 secondes puis le surnageant était aspiré. Pour libérer les restes de cellules de moelle osseuse, les morceaux d'os étaient ensuite soumis à une digestion séquentielle par la collagénase 1 mg/ml (*Clostridium Hystolyticum*, Type I ; Sigma), avec trypsine 0.5 mg/ml dans un milieu BGJb sans sérum contenant 2mM EDTA pour favoriser la chélation de calcium. La digestion a été faite à 37<sup>0</sup>C à deux reprises pour 20 minutes puis pour 4 heures dans un troisième temps. Après lavage avec le même milieu, les morceaux d'os ont été placés dans un contenant de culture de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, Lincoln Park, NJ) avec un milieu de culture standard composé de BGJb + 20% de sérum foetal bovin (FBS) (Wisent, St. Bruno, Québec, Canada) + 1% pénicilline/streptomycine (PS) et 50 µl/ml d'acide ascorbique.

### 3.1.3 Culture cellulaire

Les morceaux d'os ont été incubés à 37<sup>0</sup>C sous 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> et le milieu changé tous les deux jours. Lorsque les ostéoblastes ont commencé à migrer hors de l'os (après 7-10 jours), le milieu a été changé pour BGJb + 10% FBS + 1% PS + 50 µl d'acide ascorbique et les Ob incubés jusqu'à confluence (environ 6 semaines). Seules les cellules de premier passage ont été utilisées pour cette étude. Les Ob ainsi récupérés conservent leurs caractéristiques métaboliques *in vivo* dans des cultures *in vitro* comme déjà rapporté (Lajeunesse D, 1991; Lajeunesse D, 1996). Lorsque confluents, les Ob ont été décollés des contenants de culture avec 5 ml de Splittix-B, placés dans un tube stérile, puis centrifugés (5000 rpm; 2 minutes; 4<sup>0</sup>C) et le culot resuspendu dans le milieu de culture BGJb + 10% FBS + 1% PS + 50 µl d'acide ascorbique (5 ml).

### 3.1.4 Conditions de stimulation des ostéoblastes

Une fois le culot cellulaire resuspendu, les cellules ont ensuite étéensemencées sur des plaques 24 puits pour 2 jours puis nourries avec un milieu DMEM/F12 + 50 µl d'acide ascorbique + 0.1% de FBS. Les Ob ont été stimulés avec PMMA (2mg/ml), IL-1β (30 pg/ml), IL-6 (500 pg/ml) et TNF-α (10 ng/ml) pour 24h dans ce même milieu de culture. Après la période stimulation, les surnageants ont été gardés et congelés à -80<sup>0</sup>C avant d'être dosés. La présence de ALPase, de PGE2, de M-CSF, de IL-6 et de OPG a été évaluée.

Le PMMA a été acheté de Polyscience inc, Warrington, PA. Les particules variaient en grosseur de 1 à 10  $\mu\text{m}$  avec un coefficient de variance de 5%. Nous avons procédé à des études de microscopie à force atomique dans notre laboratoire pour confirmer ces résultats.

### **3.1.5 Évaluation de l'activité métabolique des ostéoblastes**

#### *3.1.5.1 Détermination de l'activité cellulaire de l'ALPase*

Les cellules ont d'abord été lavées deux fois avec un tampon phosphate salin (PBS, pH 7.4) L'activité de la phosphatase alcaline a été déterminée sur les extraits cellulaires par la relâche de p-nitrophénol hydrolysé à partir du p-nitrophényl phosphate (12.5 mM de concentration finale) à 37<sup>0</sup>C pour 30 minutes puis solubilisées dans le tampon ALPase (100 mM glycine, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100; pH 10.5) pour une heure en agitant à 4<sup>0</sup>C. La détermination des protéines a été faite en utilisant la méthode de l'acide bicinchonique (BCA) telle que décrite par Smith et al. (Smith PK, 1985).

#### *3.1.5.2 Détermination de la production de PGE<sub>2</sub>*

La quantité de PGE<sub>2</sub> produite dans le milieu a été mesurée en utilisant une méthode d'immunoessai enzymatique achetée chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Cette technique est basée sur la compétition entre PGE<sub>2</sub> et un traceur (PGE<sub>2</sub>-

acétylcholinestérase) pour une quantité limitée d'anticorps monoclonal dirigé contre PGE<sub>2</sub>. La sensibilité de la méthode est de 9 pg/ml et la fiabilité de la technique se situe entre 10 et 1000 pg/ml, basée sur une transformation logarithmique. La quantité de PGE<sub>2</sub> dans la membrane cellulaire des Ob n'a pas été évaluée puisque la majorité de la production de ce médiateur est immédiatement relâché dans le milieu (Raisz LG, 1990). Les manipulations ont été faites en duplicata (n=9) en accord avec les recommandations du manufacturier.

#### *3.1.5.3 Détermination de la production de IL-6 et M-CSF*

Les niveaux de production de IL-6 et de M-CSF dans le milieu de culture ont été déterminés en utilisant une technique ELISA sandwich en phase solide. Le matériel a été acheté chez R&D Systems (Minneapolis, MN). La sensibilité de la technique est de 10 pg/ml pour IL-6 et 9 pg/ml pour M-CSF. La zone de fiabilité se situe entre 39.1 et 2500 pg/ml pour IL-6 et entre 31.2 et 2000 pg/ml pour M-CSF. Chaque ELISA a été fait en duplicata (n=9) en accord avec les recommandations du manufacturier.

#### *3.1.5.4 Détermination de la production de OPG*

La quantité de OPG produite dans le surnageant des milieux de culture a été évaluée en utilisant ensemble DuoSet ELISA Development Kits de la compagnie R&D Systems (Minneapolis, MN). Ces ensembles fournissent les composantes de base nécessaires pour la réussite d'un ELISA sandwich. La zone de travail de la technique est

de 62.5 pg/ml à 4000 pg/ml pour OPG. Nous avons utilisé le matériel selon les recommandations du fabricant en employant 2 µg/ml de l'anticorps de capture (anti-OPG humain de souris) et 50 ng/ml de l'anticorps de détection (anti-OPG humain de chèvre biotynylé). Les manipulations ont été faites en duplicata pour tous les échantillons (n=9). Toutes les réactions ELISA ont été mesurées à l'aide du lecteur à ELISA microELISA Vmax photometer (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA).

### **3.1.6 Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne  $\pm$  l'erreur standard (SEM). L'analyse statistique a été faite en pratiquant un test U de bilatéralité de Mann-Whitney et le seuil critique de signification statistique a été fixé par la valeur de  $p < 0,05$ .

## **3.2 CULTURE DES EXPLANTS MEMBRANAIRES**

Cette section correspond aux manipulations visant à inhiber pharmacologiquement la production de la cascade inflammatoire par les membranes prélevées chez des patients souffrants de déscollement aseptique de prothèse de hanche.

### **3.2.1 Provenance des échantillons**

Les échantillons de membrane proviennent de la métaphyse du fémur proximal. Plus précisément, la membrane située à l'interface os/implant des zones de Gruen I et VII a été prélevée chez 20 patients (n=20) subissant une chirurgie de révision de prothèse de hanche dont la cause était l'ostéolyse périprothétique. Les indications chirurgicales incluaient la douleur et l'évidence d'ostéolyse sur les radiographies confirmée par l'absence d'os à l'interface os/implant et la migration de la prothèse. Tous les implants des patients dont des spécimens ont été prélevés possédaient un implant de couple métal/polyéthylène de haut poids moléculaire pour minimiser la variabilité interpersonnelle. L'indication chirurgicale pour la mise en place de la première prothèse était l'OA pour tous les patients. Douze hommes et huit femmes constituent notre population dont les caractéristiques basales sont comparables.

Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique et de la recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

### **3.2.2 Préparation des échantillons**

Une fois prélevés, les échantillons de membranes ont été séparés de l'os de façon stérile à l'aide d'un bistouri puis nettoyées avec une solution saline froide. Les explants sont coupés avec le bistouri en pièce de 4-5 mm de diamètre (pesant environ 250 mg) puis placés en culture sur une plaque de 12 puits (Costar, Cambridge, MA).

### **3.2.3 Incubation des échantillons**

Une fois les explants dans les puits, 4 ml de milieu de culture DMEM (GIBCO-Life Technologies, Burlington, ON) + 100 U/ml de pénicilline + 100 µg/ml de streptomycine (GIBCO-Life Technologies) a été ajouté aux puits pour l'incubation des membranes pour 72h à 37<sup>0</sup>C sous 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>. Aucun sérum n'a été ajouté au milieu de culture. Chaque échantillon a été incubé en duplicata. Des études préliminaires nous ont permis de déterminer les conditions idéales d'incubation.

### **3.2.4 Inhibition pharmacologique avec le Tenidap et le Diclofenac de la production des cytokines par les explants membranaires**

L'incubation des explants a été faite en présence ou en absence de Tenidap (Pfizer Central Research, Groton, CT) à des concentrations finales de 5, 20 ou 50 µg/ml ou de Diclofenac (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) à une concentration finale de 125 µg/ml. Ces concentrations sont compatibles avec les niveaux sériques et intra-articulaires retrouvés

chez les patients (Caldwell JR 1995; Fowler PD, 1983). Le Tenidap et le Diclofenac ont été solubilisés dans l'éthanol (concentration maximale dans chaque puit de 0,1% V/V) puis dilués pour atteindre les concentrations finales désirées. Des contrôles pour l'éthanol seul avec les explants ont aussi été faits. À la fin des périodes d'incubation, les explants ont été pesés pour normaliser les niveaux de médiateurs mesurés et exprimés en grammes de tissus poids sec (Pelletier JP, 1997).

### **3.2.5 Détermination de la production de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ et PGE<sub>2</sub> par les explants de membrane**

Après l'incubation des membranes avec ou sans médicaments pour 72h, le surnageant des milieux a été récupéré et conservé à -80°C pour dosage ultérieur.

#### *3.2.5.1 Détermination de la production de IL-1, IL-6 et de TNF- $\alpha$*

L'évaluation de la production de IL-6 par les explants de membrane dans le surnageant a été réalisée tel que décrit à la section 3.1.6.3.

La production de IL-1 et de TNF- $\alpha$  a été mesurée par la même technique que IL-6 avec des seuils de détection pour IL-6, IL-1 et TNF- $\alpha$  de 3 pg/ml, 0.3 pg/ml et 4.4 pg/ml respectivement. Le nombre d'échantillons testés est de vingt (n=20). Tous les essais sont réalisés en duplicata.

### *3.2.5.2 Détermination de la production de PGE<sub>2</sub>*

L'évaluation de la production de PGE<sub>2</sub> par les explants de membrane dans le surnageant a été réalisée tel que décrit à la section 3.1.6.2. Le nombre d'échantillons testés est de vingt (n=20). Tous les essais sont réalisés en duplicata.

### **3.2.6 Analyse statistique**

Les données sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  erreur standard (SEM). L'analyse statistique pour cette partie de l'expérimentation a été faite tel que décrit à la section 3.1.7. Toutes les manipulations ont été réalisées en duplicata.

## CHAPITRE 4 RÉSULTATS

Les résultats des différentes expérimentations sont présentés sous forme de manuscrit. La première partie de l'expérimentation portant sur l'étude du profil métabolique des ostéoblastes est présenté en premier. Ce manuscrit a été soumis en mars 2003 pour publication dans la revue «Journal of Orthopaedic Research» (en attente de réponse de l'éditeur). La seconde partie de l'expérimentation portant sur l'inhibition de la production des médiateurs inflammatoires par le Tenidap et le Diclofenac est présentée en seconde partie, toujours sous forme d'un second article. Ce manuscrit est déjà publié depuis novembre 2002 dans la revue Osteoarthritis and Cartilage (10 : 898-904). Le résumé en français de ces deux articles précède l'article proprement dit dans les deux sections.

### 4.1 RÉSUMÉ DU PREMIER ARTICLE

**Objectif :** Comparer l'effet relatif dans le déscollement d'implant orthopédique du polyméthylmétacrylate (PMMA), de l'interleukine 1 et 6 (IL-1 et IL-6) et du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sur l'activité métabolique des ostéoblastes (Ob) humains provenant de patients arthrosiques (OA).

**Méthodes :** De l'os trabéculaire de la métaphyse proximale du fémur a été prélevé de patients OA et mis en culture pour en extraire les Ob. L'activité métabolique de la cellule a été caractérisée en dosant la production de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), de phosphatase alcaline (ALPase), d'ostéoprotégérine (OPG), du facteur stimulant la lignée

macrophagique (M-CSF) et de IL-6 dans le surnageant après stimulation avec PMMA, IL-1, IL-6 et de TNF- $\alpha$ .

**Résultats :** La production de IL-6 et de PGE<sub>2</sub> a été augmentée par tous les médiateurs utilisés pour la stimulation. Par contre, seulement le PMMA et TNF- $\alpha$  ont produit des changements significatifs de OPG et de M-CSF. Le niveau de ALPase a été aussi augmenté par tous les médiateurs, mais de façon non significative. Lorsque l'on sépare les échantillons en forts ou faibles producteurs de IL-6 et PGE<sub>2</sub> avant la stimulation, on obtient deux groupes (différences significatives). Cette sous classification en groupe persiste même après stimulation des cellules.

**Conclusion :** Ces résultats montrent que le rôle du PMMA sur les cellules osseuses est comparable à celui de TNF- $\alpha$  en ce sens qu'il exerce une action double sur la cellule en favorisant la production de médiateurs de résorption osseuse et en inhibant la production de médiateurs de formation de l'os. TNF- $\alpha$  est reconnu pour jouer un rôle primordial dans le déscellement de prothèse en orthopédie en provoquant une lyse osseuse. Comme l'effet du PMMA *in vitro* est semblable à celui du TNF- $\alpha$ , le rôle de PMMA *in vivo* est probablement plus important que ce que l'on croyait jusqu'ici. Par contre, la signification des groupes de patients avec Ob métaboliquement faiblement ou fortement actif reste à être éclaircie.

**Metabolic activity of osteoblasts retrieved from osteoarthritic patients after  
stimulation with mediators involved in periprosthetic loosening**

Patrick Lavigne, Qin Shi, Daniel Lajeunesse, Faramaze Dehnade and Julio C. Fernandes\*

Osteoarthritis Research Unit, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier de l'Université de Montréal-  
Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada

**Tel:** (514) 890-8000 ext. 25544

**Fax:** (514) 412-7583

**Email:** [REDACTED]

\*To whom correspondence should be addressed:

Osteoarthritis Research Unit, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier de l'Université de Montréal-  
Hôpital Notre-Dame, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

**Short title:** Metabolic activity of osteoblasts in periprosthetic loosening

Funded in part by the Fonds de la recherche en santé du Québec and Stryker-Howmedica  
Osteonics Canada Inc.

**Keywords: Osteoblasts, osteoarthritis, osteolysis, cytokines, periprosthetic loosening**

**ABSTRACT**

**Objective:** To compare the relative effects of polymethylmetacrylate (PMMA), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) on osteoarthritic (OA) human osteoblasts (Ob) in periprosthetic loosening.

**Methods:** Ob cell cultures were prepared from metaphyseal trabecular bone of OA patients (n=9), and their cellular metabolic activity was characterized by measuring alkaline phosphatase (ALPase), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), osteoprotegerin (OPG), IL-6 and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in supernatants after Ob stimulation with PMMA, IL-1, IL-6 or TNF- $\alpha$ .

**Results:** IL-6 and PGE<sub>2</sub> production by Ob was increased significantly by all mediators used for stimulation. PMMA and TNF- $\alpha$  both stimulated M-CSF production whereas PMMA decreased and TNF- $\alpha$  augmented OPG release by Ob. All mediators failed to modify ALPase levels. Subclassification of patients into high or low endogenous producers of IL-6 and PGE<sub>2</sub> before stimulation of Ob indicated that the two subgroups maintained similar responses to stimulation by PMMA, IL-6, PGE<sub>2</sub> or TNF- $\alpha$ . However, no subgroup differences were found for OPG and ALPase.

**Conclusion:** PMMA is comparable to TNF- $\alpha$  in that it has a dual action on the cell, inhibiting at least one of its bone-forming mediators (OPG) and favouring bone resorption activators (IL-6, M-CSF, PGE<sub>2</sub>), confirming the important role of PMMA in implant loosening. However, the pertinence of high and low metabolic activities in OA Ob remains unclear, but could be involved in the pathophysiology of bone disease and aseptic loosening.

## INTRODUCTION

Implant loosening caused by periprosthetic osteolysis is a major clinical problem affecting survivorship of total joint arthroplasty<sup>8,15</sup>. Wear debris from articulating joint surfaces have been recognized as a principal factor in the osteolysis process<sup>22,28,35</sup>. Phagocytosis of wear particles is thought to be the initiating event in the biologic response leading to osteolysis, not only by macrophages, but also by osteoblasts (Ob)<sup>4,34,36</sup>. In response to phagocytosis, Ob and macrophages produce cytokines and inflammatory mediators, namely, interleukin 1 (IL-1) and 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), and osteoprotegerin (OPG), which affect, in an autocrine/paracrine manner, macrophages, Ob and the recruitment of osteoclasts, resulting in a net shift of bone homeostasis toward bone resorption<sup>7,17,26,31</sup>.

Polymethylmetacrylate (PMMA) has been used in arthroplasty since the 1960s when it was introduced by Charnley as a method of implant fixation. The effect of PMMA on macrophages and its particle size necessary to produce a biological response are well-known<sup>7,14,27</sup>. However, very few studies have investigated its effect on human Ob. Wear debris have to come into contact with bone cells at the bone-implant interface to elicit phagocytosis by the different cell types, including Ob. Many have examined the *in vitro* effect of metal ion and ultra-high molecular weight polyethylene on macrophages, human Ob and osteoblast-like cell lines. These studies revealed that the biological effect of the particles was dependent on their size, composition and concentration<sup>2,10</sup>. Recently, we researched at implant loosening in a different way. Our group examined the metabolic activity of Ob retrieved from periprosthetic trabecular

bone in failed total hip arthroplasties (fTHA) and osteoarthritis (OA) patients to identify potential early markers of osteolysis in OA patients that could have a predictive value in fTHA<sup>29</sup>. Our results showed altered Ob metabolism in patients undergoing arthroplasty revision because of periprosthetic osteolysis and a subgroup of OA patients with high basal metabolic activity. We suggested that a subgroup of patients might be prone to massive osteolysis based on their basal metabolic activity.

The aim of the present experiment was to assess the relative effect of PMMA compared to TNF- $\alpha$ , one of the major cytokines implicated in wear debris-induced osteolysis<sup>3,6,25</sup>, on the metabolic activities of OA Ob. We also wanted to better understand the physiological relevance of our high metabolic activity subpopulation of Ob described in an earlier study.

## MATERIALS AND METHODS

### *Characterization of PMMA particles*

PMMA was purchased from Polyscience Inc Warrington, PA. Its particle size ranged from 1 to 10  $\mu\text{m}$  with a 5% coefficient of variance according to the manufacturer's specifications. Atomic force microscopy was performed in our laboratory to confirm these results. A final concentration of 2 mg/ml was used for the assays.

### *In vitro Ob cell cultures*

Trabecular bone specimens were collected from Gruen zones I and VII of the femur during total hip arthroplasty (n=9). All patients were operated because of advanced hip OA. Ob cell cultures were prepared according to previously-described methods<sup>20</sup>. These cells retain their *in vivo* metabolic characteristics in *in vitro* cultures, and their

metabolic activity can be studied under these conditions, as shown previously<sup>11,20,32</sup>. Only first passage cells were used in these experiments.

Briefly, bone samples were cut into small pieces (2 mm<sup>2</sup>) prior to their sequential digestion (3 times) with collagenase (*Clostridium histolyticum*, Type 1; Sigma, St. Louis, MO) at 1 mg/ml, trypsin at 0.5 mg/ml in BGJb media without serum (Sigma) and containing 2 mM EDTA to promote extracellular calcium chelation. Digestion was performed at 37°C twice for 20 min and once for 4 h. This removed both adherent and remaining bone marrow cells from the bone pieces. After washing with the same medium, the digested bone pieces were put into 25 cm<sup>2</sup> plastic culture dishes (Falcon, Lincoln Park, NJ) and covered with BGJb medium containing 20% fetal bovine serum (FBS) (Wisent, St. Bruno, Quebec, Canada), 1% penicillin/streptomycin and 50 µl/ml ascorbic acid. This medium was changed every 2 days until cell growth appeared around the explants (usually 10 days after collagenase digestion). At this stage, the medium was changed to 10% FBS until the cells reached confluence (6 weeks). The cells were then split once at high density (50,000 cells/cm<sup>2</sup>) and placed in 24-well plates. After 2 days of recovery, they were fed once with the same medium and 2 days later with Ham's F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) containing 50 µg/ml ascorbic acid and 0.1% bovine serum albumin. The cells were then submitted to stimulation with PMMA (2 mg/ml), IL-1β (30 pg/ml), IL-6 (500 pg/ml) or TNF-α (10 ng/ml). The medium was collected at the end of incubation (24 h) and frozen at -80°C prior to assay. Alkaline phosphatase (ALPase) activity was quantified in cell extracts, whereas PGE<sub>2</sub>, M-CSF, OPG and IL-6 were evaluated in the supernatants.

#### ***Measurement of cellular ALPase***

Cellular ALPase activity was estimated in cell extracts as the release of p-nitrophenol hydrolyzed from p-nitrophenyl phosphate (12.5 mM final concentration) at 37°C for 30 min. The cells were first washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and solubilized in ALPase buffer (100 mM glycine, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100; pH 10.5) for 60 min with agitation at 4°C. Protein was measured by the bicinchoninic acid method<sup>30</sup>.

#### ***Measurement of PGE<sub>2</sub>***

The amount of PGE<sub>2</sub> released into the medium was assessed with a PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). This assay is based on competition between PGE<sub>2</sub> and a PGE<sub>2</sub>-acetylcholinesterase conjugate (PGE<sub>2</sub> tracer) for a limited amount of PGE<sub>2</sub> monoclonal antibody. The sensitivity of the method was 9 pg/ml, and the working range was between 10 and 1,000 pg/ml, based on logarithmic transformation. The majority of PGE<sub>2</sub> synthesized by Ob is immediately released into the medium rather than stored in the cell layer<sup>24</sup>. For this reason, the PGE<sub>2</sub> content of the cell layer was not examined.

#### ***IL-6 and M-CSF ELISA***

IL-6 and M-CSF levels were measured in the culture medium by specific solid-phase, double antibody ELISA. The IL-6 and M-CSF kits were from R&D Systems (Minneapolis, MN). Assay sensitivities in the ELISA plates were 10 pg/ml for IL-6, and 9 pg/ml for M-CSF. The recommended range was 39.1 to 2,500 pg/ml for IL-6, and 31.2 to 2,000 pg/ml for M-CSF. Each ELISA was performed in duplicate according to the manufacturer's specifications. The reaction was measured by microELISA Vmax photometer (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA).

### ***Measurement of OPG***

The amount of OPG produced in the medium was assessed with DuoSet ELISA development kits from R&D Systems. These kits provide the basic components required to develop sandwich ELISA. The recommended range was 62.5 and 4,000 pg/ml. We used the kit according to the manufacturer's specifications using 2 µg/ml of the capture antibody (mouse anti-human OPG) and 50 ng/ml of the detection antibody (biotynylated goat anti-human OPG).

### ***Statistical analysis***

The results are expressed as mean ± SEM. Assays were performed in duplicate. The data were analyzed statistically by the two-tailed Mann-Whitney U-test. P-values < 0.05 were considered significant.

## **RESULTS**

After collagenase digestion, the cells began to migrate out of the explants after 10 to 14 days in culture. At 5 to 6 weeks of culture, they became confluent, and were stimulated to recreate *in vitro* the inflammatory microenvironment of periprosthetic osteolysis. All assays showed detectable levels of ALPase, PGE<sub>2</sub>, OPG and IL-6 well within the working range. However, M-CSF values for the non-stimulated group were near the sensitivity level of the assay.

The samples were classified as high or low metabolic activity if their respective control values for IL-6 and PGE<sub>2</sub> were higher or similar to control values for normal Ob as determined previously<sup>29</sup>. All specimens in this study were either high or low producers of both IL-6 and PGE<sub>2</sub> at the same time. Based on that subclassification, the high

metabolic activity group contained 4 specimens, and the low metabolic activity group 5 specimens.

### ***ALPase activity***

The results after stimulation with the mediators (n=9) presented no significant difference for stimulated cells compared to basal Ob activity even though every stimulation elicited a slight increase in ALPase production, the highest being with IL-1 (data not shown).

When separated as either being above (n=4) or similar (n=5) to the mean for IL-6 and PGE<sub>2</sub>, ALPase activities were similar in both groups (data not shown), even though the activity of the high metabolic group remained higher compared to the low group for all assays.

### ***PGE<sub>2</sub> activity***

Figure 1A illustrates the level of PGE<sub>2</sub> production after stimulation (n=9). A significant elevation of the cell activity was observed for PMMA (p<0.003), IL-1 (p<0.0001), IL-6 (p<0.001) and TNF- $\alpha$  (p<0.002), with IL-6 producing the highest increase.

When the controls were subclassified as either low (n=5) or high (n=4) IL-6 and PGE<sub>2</sub> producers, a more than 3-fold difference in values was obtained (p<0.02) for the two groups. Within the high producer group, PMMA, IL-1 and TNF- $\alpha$  increased PGE<sub>2</sub> levels significantly above control values (p<0.05). Each mediator also produced a significant increase of PGE<sub>2</sub> in the low metabolic activity group (Fig. 1B). However, after stimulation, the PGE<sub>2</sub> values observed with every mediator in the high producer group were higher than in the low producer groups, the only exception being IL-6. Here, an

inversion in the ratio was seen, the low producers having a higher mean than the high subgroup. We could not explain this difference, although one of our values for IL-6 in the low subgroup was extremely high, and one in the high subgroup seemed to be lower than the other values in this group.

### ***M-CSF activity***

M-CSF production after Ob stimulation is illustrated in Figure 2 (n=9). Only PMMA ( $p<0.0002$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p<0.009$ ) evoked significant increases in M-CSF, whereas IL-1 and IL-6 failed to significantly change M-CSF production.

When separated into high or low producer subgroups, there was a notable elevation of M-CSF for PMMA and TNF- $\alpha$  in both subgroups (data not shown). As control values were very low to borderline in the low activity group before Ob stimulation, statistical significance was not calculated for M-CSF values because of possible unreliability of the assay at concentrations lower than or very close to the sensitivity margin.

### ***OPG activity***

OPG activity (n=9) is reported in Figure 3. TNF- $\alpha$  exhibited the highest stimulation ( $p<0.008$ ) as it augmented OPG three-fold. The other cytokines (IL-1 and IL-6) increased OPG production although not significantly (Figure 3A). On the other hand, PMMA decreased OPG levels three-fold ( $p<0.0002$ ).

When separated into subgroups based on their metabolic activity, there was a significant decline in OPG production in both subgroups after PMMA stimulation (three-fold reduction;  $p<0.02$  high group;  $p<0.01$  low group; Figure 3B), which was similar to what was found before subgroup separation. TNF- $\alpha$  increased OPG by two-fold in both

groups, but the change did not reach significance. Again, overall, the values for the high producers after stimulation remained higher than for the low producers, except with TNF- $\alpha$  where values were similar.

### ***IL-6 activity***

IL-6 activity in OA Ob is depicted in Figure 4A (n=9). IL-6 production after its own stimulation was not evaluated in this assay. IL-6 was strongly stimulated in Ob under the effect of IL-1 (p<0.04; >100-fold) and TNF- $\alpha$  (p<0.0001; >100-fold). PMMA also stimulated IL-6 production but to a much lesser degree (p<0.0001; >20-fold).

A significant difference was observed between samples in the high and low activity subgroups (p<0.02). All mediators significantly increased IL-6 production in both groups, although their effect was stronger in the low subgroup (p<0.05 high subgroup; p<0.02 low subgroup). IL-1 elevated IL-6 in the high activity group, by more than 185-fold.

## **DISCUSSION**

Osteolysis around orthopedic implants continues to be the major factor limiting long-term implant survival. Although most past studies have described the metabolic activity of macrophages, the importance and role of Ob are now recognized in the pathophysiology of osteolysis. The present investigation evaluated the response of human Ob to various inflammatory stimuli known to be implicated in periprosthetic osteolysis and it focused on the relative contributions of their respective actions on Ob. Our experiment also confirmed the existence of two different subpopulations of Ob responding in a different manner to inflammation *in vivo*.

In this study, ALPase and OPG served as markers of the anabolic capacity of Ob while M-CSF, IL-6 and PGE<sub>2</sub> evaluated their catabolic activity. ALPase is a well-known marker of bone deposition, and the regulation of OPG coupled with RANKL has been described in the maintenance of bone homeostasis<sup>12</sup>. OPG is a soluble inhibitor of RANKL, which is implicated in osteoclast recruitment through TRAF-6 and c-Fos cellular signaling<sup>31</sup>. IL-6 and PGE<sub>2</sub> are important mediators for Ob and the control of bone resorption. IL-6, a potent osteoclast activator, is produced in the synovial fluid of fTHA 10 times more with osteolysis than without osteolysis, and PGE<sub>2</sub> has been reported to play a major role in osteolysis<sup>4,19,34</sup>. On the other hand, M-CSF is a necessary growth factor for osteoclasts as it modulates the differentiation, survival and migration of osteoclastic cell lineage and the maturation of macrophages<sup>35</sup>. We used IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and PMMA to recreate the inflammatory microenvironment found in osteolysis. IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  are associated with periprosthetic osteolysis and are major contributors to this phenomenon<sup>4,21</sup>. On the other hand, the action of PMMA on Ob in wear-induced osteolysis has been studied less extensively, as much of the work so far has concentrated on its action in macrophages<sup>16,33</sup>.

Our results showed that Ob were affected by PMMA, IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ . The impact of PMMA seemed important in terms of bone homeostasis by significantly decreasing OPG, not affecting ALPase, and stimulating the production of IL-6, PGE<sub>2</sub> and M-CSF in a significant manner. This dual action on Ob could induce a shift in bone homeostasis toward bone resorption. It was the only mediator in our experiments that presented a dual effect. Moreover, Granchi et al. have shown recently that cement induces RANKL and increases the RANKL/OPG ratio in MG63 cells, which

corroborates our data <sup>9</sup>. The increment of M-CSF after PMMA stimulation was also significant. M-CSF is imperative for macrophage maturation and, eventually, for differentiation into osteoclasts under the action of RANKL <sup>18,35</sup>. The influence of PMMA on Ob *in vivo* could be mediated via a diminution of bone formation through the inhibition of type 1 collagen production by an increase in IL-6 and PGE<sub>2</sub> and/or via facilitation of osteoclast recruitment by an increment of M-CSF and a decrease of OPG.

OPG and M-CSF activities were also modified by TNF- $\alpha$  in a positive manner. It seems paradoxical to observe such an effect since OPG is associated with inhibition of the bone resorption cascade, and M-CSF with its stimulation, but TNF- $\alpha$  has also been shown to heighten RANKL expression <sup>13</sup>, and the RANKL/OPG ratio could probably be increased, having a net catabolic activity on bone. IL-6 expression was also strongly stimulated by all mediators, particularly IL-1, confirming its primary role as a regulator of Ob metabolism in an *in vitro* inflammatory environment.

The second part of our study was aimed at understanding the behavior of Ob subgroups based on their metabolic activity. Our laboratory has reported an altered metabolism in Ob from subchondral and trabecular bone in OA <sup>1,11,23</sup> and in revision surgery from fTHA with and without osteolysis <sup>5,29</sup>. However, no physiological or clinical role of these subpopulations has yet been identified. The initial description of this metabolic difference was based on IL-6 and PGE<sub>2</sub>, and we analyzed ALPase, OPG, IL-6 and PGE<sub>2</sub> here to see if this scenario could apply to them as well. No significant differences were demonstrated between the high and low metabolic activity subgroups for OPG and ALPase. However, we found two subgroups of Ob for IL-6 and PGE<sub>2</sub> based on their basal production. Even after stimulation, the trend for high producers to remain

higher than the low producers in response to cytokines and particle challenge could not be attenuated. We, therefore, think that the difference observed in the two groups is not just the reflection of a transient change in the metabolic activity of the cells but probably more of a constitutive metabolic expression since Ob should normally respond equally to the same stimulation in such an *in vitro* setting. This constitutive high metabolic activity of Ob cells should, therefore, also represent more active bone metabolism *in vivo*.

In all specimens, IL-6 and PGE<sub>2</sub> syntheses were closely related, and so were OPG and ALPase syntheses. These activity associations between bone-resorbing mediators (IL-6 and PGE<sub>2</sub>) and bone-forming mediators (OPG and ALPase) could be a reflection of the *in vivo* metabolic state of trabecular bone as being either in an intense remodeling phase or in a resting state. Moreover, basal OPG and ALPase levels did not differ significantly in the high and low subgroups, unlike IL-6 and PGE<sub>2</sub>. The higher production of catabolic markers in the high subgroup combined with a comparable level of anabolic markers in both groups could mean that the high activity group was more active toward bone catabolism compared to the low activity group, since the disparity between the anabolic and catabolic capacity of Ob for that group was more significant than the low subgroup. Combined with a significant decrease of OPG production by Ob when stimulated with PMMA, this observation indicates that patients with high Ob activity could be more at risk for periprosthetic loosening.

Why low producer cells are less sensitive to mediators of inflammation is not well understood. It is appealing to think that those Ob producing less IL-6 and PGE<sub>2</sub> could also generate more type 1 collagen and have a lower potential for osteoclast recruitment, while the opposite situation could apply to the high producer group, but this remains to be

proven. However, the observation that the high OA producers were more sensitive to PMMA and IL-1 $\beta$  stimulation strongly suggests that Ob from these individuals would be more sensitive to cement debris and/or inflammatory stresses, thereby leading to more pronounced osteolysis. These individuals would again be more at risk for implant failure.

Our results demonstrated a more important role for PMMA in Ob metabolism than initially believed. The role of PMMA seems to be as significant as TNF- $\alpha$ , as witnessed by its dual action on cellular activity. Also, more evidence points towards two different OA patient subpopulations based on the metabolic activity of their Ob, although the clear involvement of these Ob in the pathophysiology of bone disease and implant loosening remains to be shown. Improving implant anchoring to bone with a less metabolically-active material and clarifying the exact role of Ob populations could potentially prevent or slow down periprosthetic osteolysis, thereby minimizing long-term complications and the cost to patients undergoing total replacement arthroplasties.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Mr. Ovid Da Silva for editing this manuscript.

## REFERENCES

- 1-Benderdour M, Hilal G, Lajeunesse D et al. Osteoarthritic osteoblasts show variable levels of cytokines production despite similar phenotypic expression. *Arthritis Rheum* 42: S251 (abstract), 1999.
- 2-Catelas I, Huk OL, Petit A et al. Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effect of size, composition and concentration. *J Biomed Mater Res* 41: 600-7, 1998.
- 3-Clohisy JC, Teitelbaum S, Chen S et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates polymethylmetacrylate particle-induced NF-kappaB activation in osteoclast precursor cells. *J Orthop Res* 20: 174-81, 2002.
- 4-Dean DD, Schwartz Z, Liu Y et al. The effect of ultra-high molecular weight polyethylene wear debris on MG63 osteosarcoma cells in vitro. *J Bone Joint Surg Am* 81: 452-61, 1999.
- 5-Fernandes JC, Lajeunesse D, Shi Q et al. Metabolic activity of osteoblast-like cells from periprosthetic trabecular bone in failed total hip arthroplasties as marker of osteolysis and loosening. *Arthritis Rheum* 43: S207 (abstract), 2000.
- 6-Fuller K, Murphy C, Kirstein B et al. TNF-alpha potentially activates osteoclasts through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology* 143: 1108-18, 2002.
- 7-Glant TT, Jacobs JJ, Molnar G et al. Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages. *J Bone Miner Res* 8: 1071-9, 1993.
- 8-Goldring SR, Clark CR, Wright TM: The problem in total joint arthroplasty: aseptic loosening. *J Bone Joint Surg Am* 75: 799-801, 1993.

- 9-Granchi D, Cenni E, Savarino L et al. Bone cement extracts modulate the osteoprotegerin/osteoprotegerin-ligand expression in MG63 osteoblast-like cells. *Biomaterials* 23: 2359-65, 2002.
- 10-Haynes DR, Boyle SJ, Rogers SD et al. Variation in cytokines induced by particles from different prosthetic materials. *Clin Orthop* 352: 223-30, 1998.
- 11-Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP et al. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* 41: 891-9, 1998.
- 12-Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140: 4382-9, 1999.
- 13-Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR et al. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25: 255-9, 1999.
- 14-Horowitz SM, Doty SB, Lane JM, Burtein AH. Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmetacrylate leads to bone resorption. *J Bone Joint Surg* 75A: 802-13, 1993.
- 15-Huddleston HD: Femoral lysis after cemented hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 3: 285-97, 1988.
- 16-Ingham E, Green TR, Stone MH et al. Production of TNF- $\alpha$  and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles. *Biomaterials* 21: 1005-13, 2000.

- 17-Jones LC, Hungerford LS. Cement disease. *Clin Orthop* 311: 46-53, 1987.
- 18-Kong YY, Yoshida H, Sarosi I et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397: 315-23, 1999.
- 19-Lader CS, Flanagan AM. Prostaglandin E<sub>2</sub>, interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 139: 3157-64, 1998.
- 20-Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG63. *Bone Miner* 14: 237-50, 1991.
- 21-Lavigne P, Shi Q, Jolicoeur FC et al. Modulation of IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha and PGE<sub>2</sub> by pharmacological agents in explants of membranes from failed total hip replacement. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 898-904, 2002.
- 22-Margevicius KJ, Bauer TW, McMahon JT et al. Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J Bone Joint Surg Am* 76: 1664-75, 1994.
- 23-Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M et al. Can altered production of IL-1 $\beta$ , IL-6, transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblast identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 491-500, 2002.
- 24-Raisz LG, Fall PM. Biphasic effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology* 126: 1654-9, 1990.

- 25-Schwarz EM, Lu AP, Goater JJ et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ /nuclear transcription factor- $\kappa$ B signalling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 18: 472-80, 2000.
- 26-Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J et al. Cellular mediators secreted by interfacial membrane obtained at revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 10: 498-506, 1995.
- 27-Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J et al. Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro. *J Orthop Res* 13: 792-801, 1995.
- 28-Shanbhag AS, Jacobs JJ, Glant TT et al. Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 76: 60-7, 1994.
- 29-Shi Q, Lajeunesse D, Reboul P et al. Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic trabecular bone in failed total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. *J Rheumatology* 29: 1437-45, 2002.
- 30-Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.
- 31-Takayanagi H, Kim S, Matsuo K et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- $\beta$ . *Nature* 416: 744-9, 2002.
- 32-Tanaka Y, Maruo A, Fujii K et al. Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators. *J Bone Miner Res* 15 :1912-23, 2000.
- 33-Trindade MCD, Lind M, Nakashima Y et al. Interleukin-10 inhibits polymethylmetacrylate particle induced interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  release by human monocyte/macrophages in vitro. *Biomaterials* 22: 2067-73, 2001.

34-Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ et al. The effect of particulate wear debris, cytokines and growth factors on the functions of MG63 osteoblasts. *J Bone Joint Am* 83: 201-11, 2001.

35-Wiktor-Jedrzejczak W, Urbanowska E, Aukerman SL et al. Correction by CSF-1 of defects in the osteopetrotic (*op/op*) mouse suggests local, developmental and humoral requirements for this growth factor. *Exp Hematol* 19: 1049-54, 1991.

36-Yao J, Cs-Szabò G, Jacobs JJ et al. Suppression of osteoblast function by titanium particles. *J Bone Joint Surg Am* 79: 107-12, 1997.

### Legends to figures

**Figure 1: A) PGE<sub>2</sub> production after Ob stimulation.** Human OA Ob were co-incubated for 24 h in the presence of PMMA (2 mg/ml), IL-1 $\beta$  (30 pg/ml), IL-6 (500 pg/ml) or TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). PGE<sub>2</sub> activity was measured by enzyme immunoassay. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Each assay was performed in duplicate (n=9).

**B) PGE<sub>2</sub> production after Ob stimulation and classification of metabolic activity.**

Each specimen from Figure 1A was subclassified based on the value observed for PGE<sub>2</sub> as being higher (n=4) or lower (n=5) than the mean. Values are presented as mean  $\pm$  SEM.

\* p<0.05; Control vs mediator same group

° p<0.02; Control high metabolic activity vs control low metabolic activity

\*\*p<0.01; Control vs mediator same group

**Figure 2: M-CSF production after Ob stimulation.** Human OA Ob were co-incubated for 24 h in the presence of PMMA (2 mg/ml), IL-1 $\beta$  (30 pg/ml), IL-6 (500 pg/ml) or TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). M-CSF activity was measured by ELISA. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Each assay was performed in duplicate (n=9).

**Figure 3: A) OPG production after Ob stimulation.** Human OA Ob were co-incubated for 24 h in the presence of PMMA (2 mg/ml), IL-1 $\beta$  (30 pg/ml), IL-6 (500 pg/ml) or TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). OPG activity was measured by DuoSet ELISA. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Each assay was performed in duplicate (n=9).

**B) OPG production after Ob stimulation and classification of metabolic activity.**

Each specimen from Figure 3A was subclassified based on the value observed for OPG as being higher (n=4) or lower (n=5) than the mean. Values are presented as mean  $\pm$  SEM.

\*p<0.02; Control vs PMMA same group

\*\*p<0.01; Control vs PMMA same group

**Figure 4: A) IL-6 production after Ob stimulation.** Human OA Ob were co-incubated for 24 h in the presence of PMMA (2 mg/ml), IL-1 $\beta$  (30 pg/ml) or TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). IL-6 activity was measured by ELISA. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. Each assay was performed in duplicate (n=9).

**B) IL-6 production after Ob stimulation and classification of metabolic activity.**

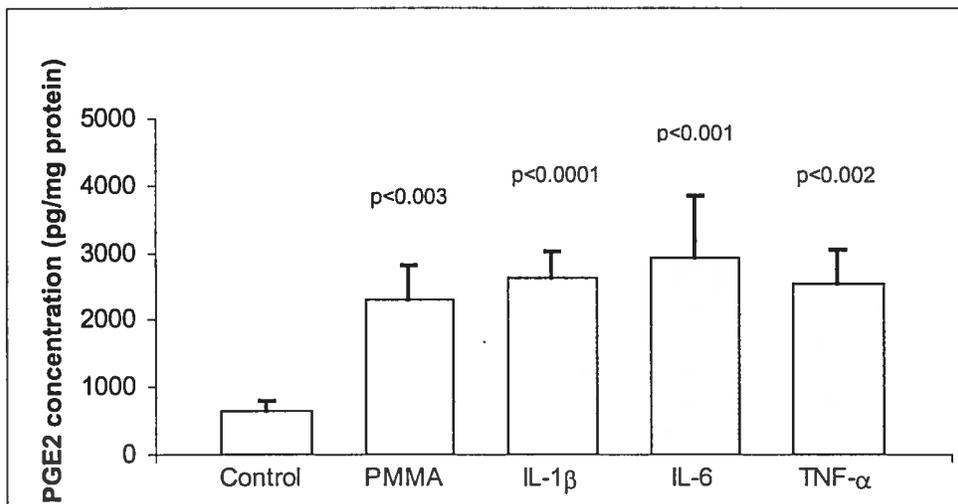
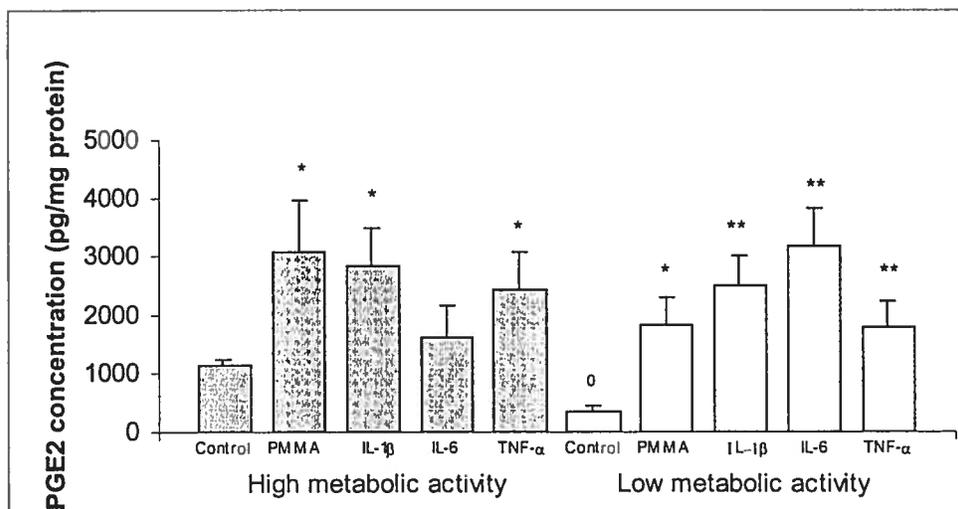
Each specimen from Figure 4A was subclassified based on the value observed for IL-6 as being higher (n=4) or lower (n=5) than the mean. Values are presented as mean  $\pm$  SEM.

\* p<0.05; Control vs mediator same group

° p<0.02; Control high metabolic activity vs control low metabolic activity

\*\*p<0.02; Control vs mediator same group

Figure 1

A) PGE<sub>2</sub> production after Ob stimulationB) PGE<sub>2</sub> production after Ob stimulation and classification of metabolic activity

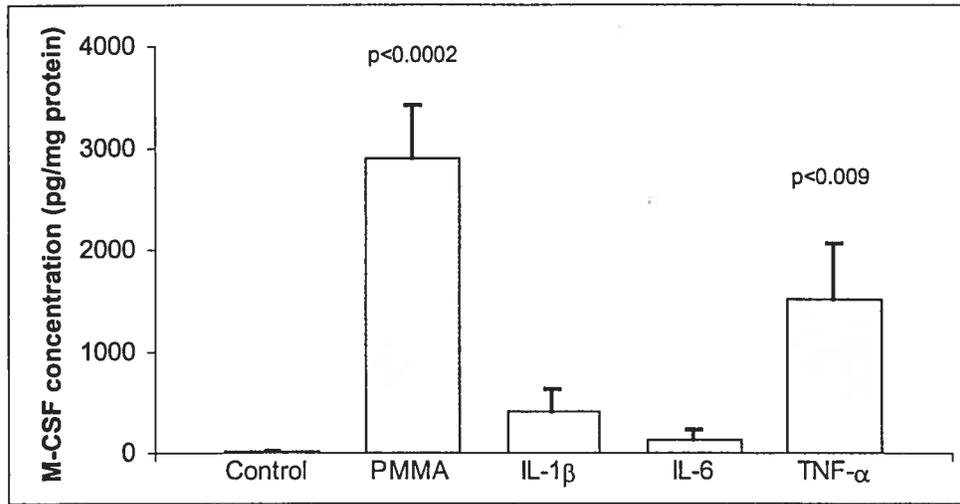
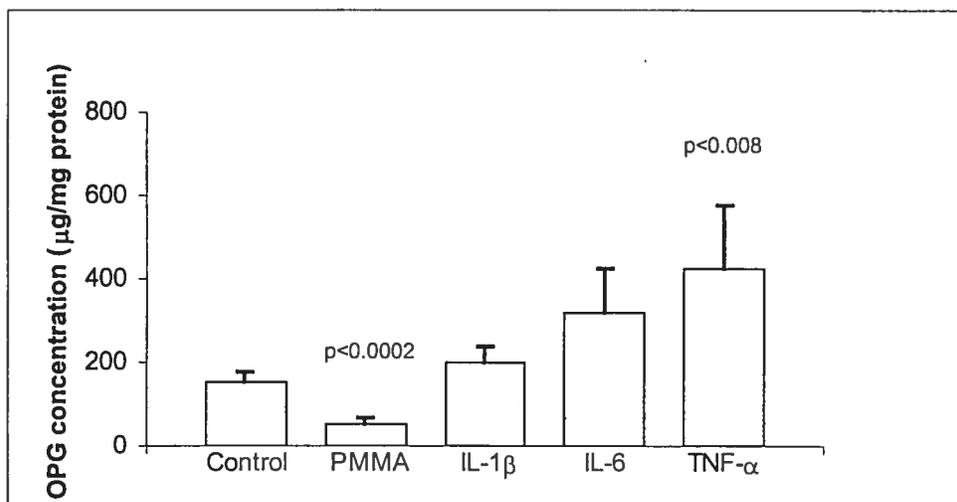
**Figure 2 M-CSF production after Ob stimulation**

Figure 3

## A) OPG production after Ob stimulation



## B) OPG production after Ob stimulation and classification of metabolic activity

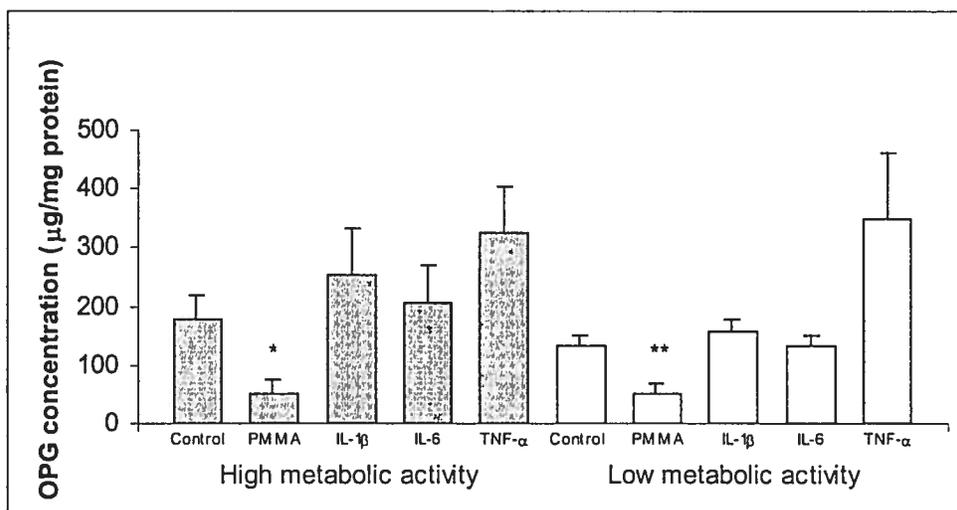
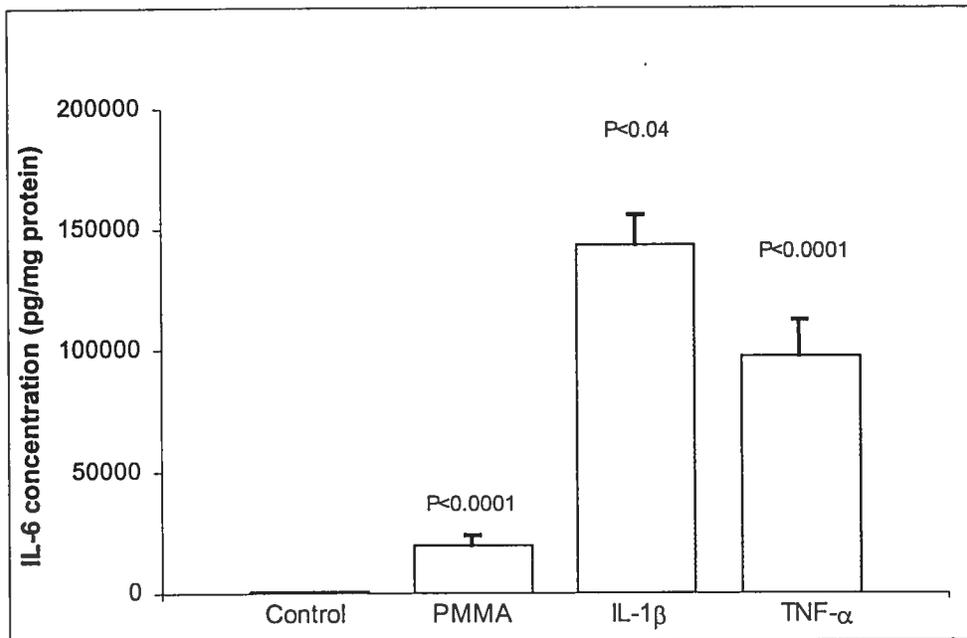
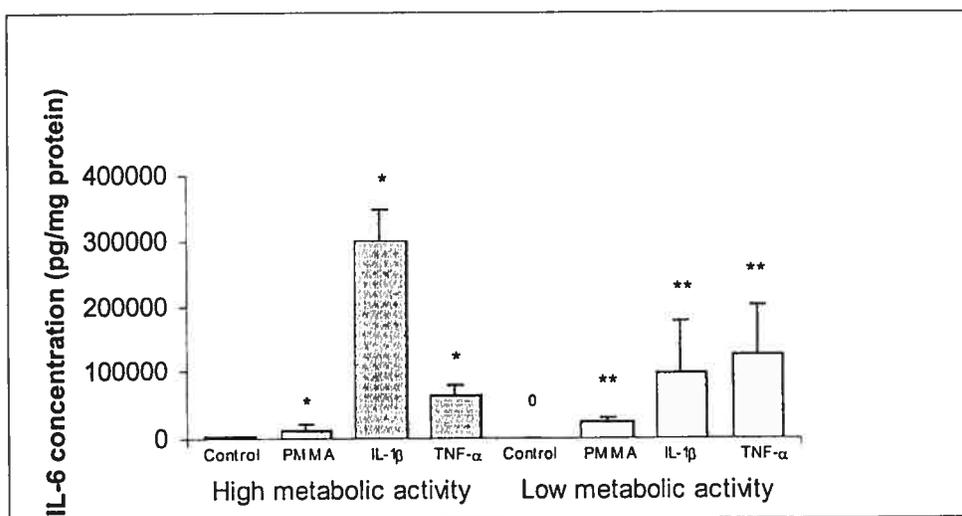


Figure 4

## A) IL-6 production after Ob stimulation



## B) IL-6 production after Ob stimulation and classification of metabolic activity



## 4.2 RÉSUMÉ DU SECOND ARTICLE

**Introduction et objectif:** Les prostaglandines et les cytokines jouent un rôle important dans la pathophysiologie de l'ostéolyse et du déscollement aseptique de prothèse. Le but de cette étude est d'évaluer le rôle de médicaments dans l'inhibition de la production de l'interleukine 1 et 6 (IL-1 et IL-6), de la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sur des explants de membranes provenant de patients avec déscollement d'implant à la hanche.

**Matériel et méthodes :** Les explants de membranes ont été prélevés per-opératoire chez des patients subissant une chirurgie de révision de prothèse de hanche pour déscollement aseptique (n=20) puis incubés pour 72h avec ou sans Tenidap (concentrations de 5  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml et 50  $\mu$ g/ml) et Diclofenac (125  $\mu$ g/ml). La production de IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub> et TNF- $\alpha$  a été dosée dans le surnageant avant et après incubation avec les agents pharmacologiques par technique ELISA.

**Résultats :** Une inhibition significative de IL-1 par le Tenidap 20  $\mu$ g/ml et 50  $\mu$ g/ml (71.3%,  $p < 0.05$ ; 79.3%,  $p < 0.02$ ) a été trouvée. Les niveaux de IL-6 ont été abaissés de 90.4% et 96.0% pour les mêmes concentrations de Tenidap ( $p < 0.005$  et  $p < 0.05$ ). Le même effet a pu être observé pour le TNF- $\alpha$  avec une diminution de 66.9% et de 77.4% pour les mêmes concentrations de Tenidap ( $p < 0.05$  et  $p < 0.05$ ). L'effet du Tenidap sur la diminution de la production de PGE<sub>2</sub> a aussi été significative, aux trois concentrations de Tenidap cette fois-ci ( $> 90\%$ ;  $p < 0.0001$ ). Le Diclofenac quant à lui diminue le production de PGE<sub>2</sub> de façon significative ( $> 95\%$ ,  $p < 0.0001$ ), mais il n'a eu aucun effet sur la production des autres médiateurs.

**Conclusion :** L'effet double du Tenidap sur l'inhibition de la production des cytokines et des prostaglandines s'avère un atout dans le traitement de l'ostéolyse périprothétique. Ceci pourrait permettre d'accroître la survie des implants et d'ouvrir la voie à de nouvelles avenues de recherche pour le traitement pharmacologique de l'ostéolyse et du déscellement de prothèse.

**Modulation of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> by pharmacological agents  
in explants of membranes from failed total hip replacement**

P. Lavigne, Q. Shi, F.C. Jolicoeur, J.-P. Pelletier, J. Martel-Pelletier and J.C. Fernandes

Published in : **Osteoarthritis and Cartilage** (2002) 10, 898-904

Osteoarthritis Research Unit and Orthopedics Department, Hôpital Notre-Dame, Centre  
Hospitalier Universitaire de l'Université de Montréal, 1560 rue Sherbrooke Est,  
Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

**Tel :** (514) 890-8000 ext. 25544

**Fax :** (514) 412-7583

**Email :** 

\*To whom correspondence should be addressed

**Key words:** Osteolysis, Total hip replacement, Cytokines, Tenidap

**ABSTRACT**

**Introduction and goal:** Proinflammatory cytokines and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) play an important role in the pathophysiology of osteolysis and implant loosening. The aim of this study was to evaluate the role of pharmacological agents in the inhibition of Interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and PGE<sub>2</sub> in explants of interface membranes from failed total hip replacements.

**Material and Methods:** Membranes from failed total hip arthroplasty were retrieved (n=20) and explants incubated for 72h in the absence or presence of Tenidap at three different concentrations (5, 20 or 50  $\mu$ g/ml) or Diclofenac (125  $\mu$ g/L). IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and PGE<sub>2</sub> levels were measured in the culture medium using ELISA kits. Statistical analysis was done using the Mann-Whitney u-test.

**Results:** A statistically significant decrease in the IL-1 $\beta$  synthesis was found at two Tenidap concentrations of 20  $\mu$ g/ml (71.3%, p<0.05) and 50  $\mu$ g/ml (79.3%, p<0.02). Tenidap reduced IL-6 levels by 90.4% at 20  $\mu$ g/ml (p<0.005) and 96.0% (p<0.05) at 50  $\mu$ g/ml. Tenidap also reduced the synthesis of TNF- $\alpha$  by 66.9% (p<0.05) and 77.4% at concentrations of 20  $\mu$ g/ml and 50  $\mu$ g/ml. Tenidap had a marked suppressive effect over 90% (p<0.0001) on PGE<sub>2</sub> synthesis at all three concentrations. Diclofenac (125  $\mu$ g/L) decreased PGE<sub>2</sub> production by 95% (p<0.0001), but had no significant effect in IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF levels in culture medium.

**Conclusion:** The ability to simultaneously suppress the release of proinflammatory cytokines and PGE<sub>2</sub> may help control osteolysis and prevent aseptic loosening of THR. This effect could increase implant longevity and lead the way to the pharmacological treatment of this pathology.

## INTRODUCTION

Total hip replacement (THR) is the procedure of choice for patients over the age of 60 suffering from osteoarthritis (OA). Approximately 240,000 THR are performed every year in the US and Canada, and roughly 10% of these surgeries are revisions due to aseptic loosening. The pathophysiology of osteolysis in failed THR (fTHR) is related to a heavy macrophage response to implant debris at the bone-implant interface and the expression of several cytokines, namely tumor necrosis factor (TNF-  $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6, prostaglandins (PG), metalloproteinases (MMP) and nitric oxide (NO). Moreover, most data in the literature have shown that the failure process is likely to have multifactorial causes, including prosthetic design, metal alloy debris, stress shielding, cement debris and more recently polyethylene wear debris (1-3).

Abundant wear debris and macrophages are found within membranes and synovial fluid surrounding loosened total hip prosthesis (4). It has also been demonstrated that macrophages could differentiate directly into osteoclastic bone resorbing cells (5), although the main pathway to macrophage differentiation into osteoclasts responsible for bone resorption in fTHR seems to be osteoblast-dependent (6).

To date, there is no effective treatment other than a revision surgery for patients with THR loosening once osteolysis is diagnosed. Understanding the pathophysiology of osteolysis and the identification of the key modulators of the inflammatory cascade generated by wear debris in recent years has paved the way to potential pharmacological treatment of THR failure (7). Although still experimental, these studies demonstrate that a new era in the prevention and treatment of osteolysis and THR failure is starting (8,9). Several drugs which inhibit prostaglandin synthesis have been examined in OA and

wear debris-mediated osteolysis (10). In OA, tiaprofenic acid showed modest activity (11), diclofenac was inactive (12), naproxen may affect some biochemical parameters (13), and aspirin accelerated the development of severe OA (14). In a wear debris model of osteolysis, indometacin increased TNF- $\alpha$  expression by three-fold (7), while pentofilin (15) and etanercept (16) inhibited TNF- $\alpha$  expression and the progression of experimental osteolysis.

Tenidap is an experimental antirheumatic drug of the oxindole class (17). This drug has a dual action — inhibiting cyclooxygenases (18) and the production of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  in human cell (19), synovial membrane explants from rheumatic arthritis patients (20,21), and on a dog model of OA (12). Tenidap has been demonstrated to be an effective drug in the treatment of rheumatoid arthritis (22-24). *In vivo*, this drug was shown to be capable of reducing, in arthritic patients, several biological markers of inflammation and IL-6 (19, 21, 22). The effect of tenidap on CRP and SAA proteins is likely related to the suppression of cytokine synthesis (19, 21, 25). The relevance of tenidap's action as a cytokine modulating agent vis-à-vis osteolysis is most interesting as several reports have indicated that, at the clinical stage of the disease, variable degrees of inflammation are present (26, 27) and that interface membranes in failed THR synthesize an increased amount of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> (28).

The aim of this study was to evaluate the efficacy of simultaneous inhibition of cytokines and PGE<sub>2</sub> in response to Tenidap, a potent cytokine modulator, in explants of interface membranes from failed total hip arthroplasties, and to compare their effect with Diclofenac, a currently used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID).

## MATERIAL AND METHODS

### *Patient characteristics*

Interface membrane specimens were obtained from Gruen zones I and VII (29) at the time of surgery from 20 patients undergoing revision procedures for clinical failure of total hip arthroplasty (Table 1). All patients had a failed hybrid THR with a metal on ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) bearing in order to minimize individual variability due to different wear debris.

The indication for a revision included pain and evidence of loosening. The presence of radiolucent lines at the bone interface and the migration of a component according to radiographic data confirmed loosening. The radiographs from the loose implants with osteolysis contained one or more areas showing ballooning and radiolucent zones with scalloped edges adjacent to the cement mantle or bone.

Twelve of the 20 patients were men and 8 were women. The mean age ( $61.7 \pm 5.6$  years,  $65.4 \pm 5.6$  years old, mean  $\pm$  SEM, respectively) and the time to revision ( $57.0 \pm 12.9$  months,  $49.2 \pm 11.5$  months, mean  $\pm$  SEM, respectively) for both men and women were similar. In all patients, both clinical and radiographic appearances were of aseptic prosthetic failure. Infection cases were excluded by clinical history and microbiology confirmation.

This study was approved by the Institutional Research Committee/Institutional Ethics Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

### Explant culture

Each interface membrane was aseptically dissected from underlying fibrous and fatty tissues and rinsed in cold saline solution. Tissue samples were sectioned into small fragments of 4 - 5 mm in diameter. Explants weighing roughly 250 mg were processed, randomly divided, and placed in 12 well plates (Costar, Cambridge, MA, JSA) with 4 ml Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO-Life Technologies, Burlington, ON, Canada), containing penicillin and streptomycin sulfate (100 U/ml and 100 µg/ml, respectively; GIBCO). No serum was present in the culture medium (20). Pilot studies were performed at 24h, 48h and 72h incubation to determine the ideal experimental conditions. Cultures were incubated at 37°C for 72h in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air mixture in the absence or presence of Tenidap ([Z]-5-chloro-2, 3 dihydro-3-[hydroxy-2-thienyl methylene]-oxo-1H-indole-1-carboxamide, sodium salt) (Pfizer Central Research, Groton, CT, USA) at final concentrations of 5, 20 or 50 µg/ml or Diclofenac sodium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at final concentration of 125 µg/L. The ideal therapeutic plasma level in patients is 20 µg/ml for Tenidap (30). The concentration of Diclofenac used in the present *in vitro* experiments was similar to therapeutic levels found in plasma and synovial fluid after oral administrations of the drug in humans (31).

Tenidap and Diclofenac were dissolved in ethanol and further diluted to achieve the required final concentrations. In each incubation well, the ethanol concentration did not exceed 0.1% (V/V). For each specimen, there were appropriate controls for ethanol. At the end of the incubation period, explants were weighed to normalize cytokine and PGE<sub>2</sub> levels as per gram of tissue wet weight (GWW) (32), and the culture medium was collected and stored at -80°C until further use (20).

### ***Cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) determination***

The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF-  $\alpha$  were determined in the culture medium of membrane explants by using specific solid phase, double antibody, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (33). The IL-1 $\beta$ , IL-6 Kit and TNF-  $\alpha$  (high sensitivity) were obtained from R&D Systems, (Minneapolis, MN, USA). Each ELISA was performed according to the manufacturer's specification. Sensitivity to the culture medium was 0.3 pg/ml for IL-1 $\beta$ , 3 pg/ml for IL-6 and 4.4 pg/ml for TNF-  $\alpha$ .

### ***PGE<sub>2</sub> determination***

PGE<sub>2</sub> was measured in the explant culture supernatants using the PGE<sub>2</sub> Immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). This assay is based on the competition between PGE<sub>2</sub> and a PGE<sub>2</sub>-acetylcholinesterase conjugate (PGE<sub>2</sub> tracer) for a limited amount of PGE<sub>2</sub> monoclonal antibody (33).

All reactions were measured on a micro-ELISA Vmax photometer (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA). Data were expressed in ng/g tissue wet weight (ng/gww, IL-6 or PGE<sub>2</sub>) or pg/g tissue wet weight (pg/gww), IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$ ) (32).

### **Statistical analysis**

Twenty patients were included in this study (n = 20). Each membrane explanted from a given patient was tested for every experimental condition (n = 20). To avoid discrepancies in cytokine and PGE<sub>2</sub> levels when working with explants, two samples of the same membrane were cultured for every experimental condition and the mean result of the two was included in the statistical analysis as the only corresponding data for a given patient. Our statistical analysis was therefore based on twenty separate results for

every variable ( $n = 20$ ). Mean values and standard errors of the mean were calculated, and statistical analysis was done using the Mann-Whitney u-test. P values equal or less than 0.05 were considered significant.

## *RESULTS*

### *Cytokine and PGE<sub>2</sub> synthesis in explants*

Preliminary experiments were carried out using revision interface membranes explants, and the level of inflammatory mediators was measured. Cytokine levels over various lengths of incubation time were also measured, and the optimal incubation time was found to be 72h.

At first, we examined the level of cytokine and PGE<sub>2</sub> synthesis in membrane specimens of loosened implant with osteolysis. The membrane explants produced IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>. Cytokine and PGE<sub>2</sub> production varied considerably between patient samples. The secretion of IL-1 $\beta$  ( $194.72 \pm 52.47$  pg/gw, mean  $\pm$  SEM) and TNF- $\alpha$  ( $4.04 \pm 0.70$  pg/gww, mean  $\pm$  SEM) were in the picogram range, while the levels of IL-6 ( $183.34 \pm 110.04$  ng/gww, mean  $\pm$  SEM) and PGE<sub>2</sub> ( $791.53 \pm 310.99$  ng/gww, mean  $\pm$  SEM) were in the nanogram range.

### *Effects of drugs on cytokines and PGE<sub>2</sub>*

IL-1 $\beta$  was detected on all the specimens used. As shown in Figure 1, a statistically significant decrease in the IL-1 $\beta$  synthesis was found at two Tenidap concentrations tested; with inhibition of 71.3% ( $p < 0.05$ ) at a therapeutic (20  $\mu$ g/ml) concentration and 79.3% ( $p < 0.02$ ) at a supra-therapeutic concentration (50  $\mu$ g/ml). Although the level of IL-1 $\beta$  in the Tenidap-treated specimens was reduced by 51.0% at a concentration of 5

$\mu\text{g/ml}$ , these results are not statistically different from the untreated (control) specimens. Diclofenac ( $125 \mu\text{g/L}$ ) had no significant effect on the inhibition of IL-1 $\beta$  synthesis.

The interface membrane explants produced a very high level of IL-6 compared with the two other cytokines studied (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ). Our results showed that Tenidap, at a sub-therapeutic concentration ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), reduced IL-6 production by 77.5%, but there was no significant difference with the control group (Figure 2). The reduction was statistically significant at 90.4% ( $p < 0.005$ ) and 96.0% ( $p < 0.05$ ) at  $20 \mu\text{g/ml}$  and  $50 \mu\text{g/ml}$ , respectively. The level of IL-6 in Diclofenac-treated explants was similar to that in the control.

We could only detect TNF- $\alpha$  levels in the specimens with a high sensitivity ELISA kit. The levels of TNF- $\alpha$  protein were relatively small compared with the other two cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-6) tested. The level of TNF- $\alpha$  in the specimens treated with  $5 \mu\text{g/ml}$  Tenidap was slightly higher than the control. In the presence of Tenidap, a reduction of synthesis of 66.9% ( $p < 0.05$ ) and 77.4% was noted at concentration of  $20 \mu\text{g/ml}$  and  $50 \mu\text{g/ml}$ . There was no statistically significant difference between  $20 \mu\text{g/ml}$  and the control. The level of TNF- $\alpha$  in the Diclofenac-treated explants ( $125 \mu\text{g/l}$ ) was not changed compared to the untreated control (Figure 3).

A significant level of PGE<sub>2</sub> was present in all interface membranes. Tenidap had a marked and significant suppressive effect at all three concentrations used ( $5 \mu\text{g/ml}$ ,  $20 \text{mg/ml}$  and  $50 \mu\text{g/ml}$ , respectively) on PGE<sub>2</sub> synthesis. Inhibition higher than 90% ( $p < 0.0001$ ) was observed for all tissues examined. Similarly, Diclofenac significantly inhibited ( $p < 0.0001$ ) PGE<sub>2</sub> production at the interface membranes by 95% using therapeutic concentrations of the drug ( $125 \mu\text{g/l}$ ) (Figure 4).

## DISCUSSION

This study shows that tissue retrieved from fTHR synthesized significant levels of proinflammatory cytokines and PG. Indeed, high levels of PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were found in tissue surrounding loose implant with osteolysis. This phenomenon suggests that numerous cytokines and other proinflammatory mediators are produced by bone tissue and interface membranes of loosened prosthesis and that specific cytokines, namely IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  are associated with osteolysis (34). We have run preliminary assays at 24h, 48h and 72h in a pilot study to address the question whether tissue extracts should have been used instead of culture medium after 72h incubation in order to detect fine differences in our *in vitro* system. TNF- $\alpha$  was not detectable in significant levels prior to 72 h incubation in the culture medium and, yet, a TNF- $\alpha$  high-sensitivity kit from R & D Systems (Minneapolis, USA) had to be used. Moreover, IL-1 $\beta$  levels were also at the picogram range at 72h. Since TNF- $\alpha$  is considered to be the single most important cytokine implicated in wear-debris induced osteolysis (35-37), it seems logical that the other cytokines and PGE<sub>2</sub> should also be measured at 72 hours. Our group has already successfully measured cytokine levels in the culture medium of RA synovial membranes explants at 72h incubation with consistent results (20).

This corroborates the numerous studies that suggest the excess synthesis and secretion of proinflammatory cytokines from macrophages stimulated with wear particles play a major role in the pathophysiology of osteolysis and loosening process (38, 39). Cytokines exert their action by binding to specific cell membrane receptors and transducing intracellular signals. IL-1 and TNF- $\alpha$  are very potent inducers of proteolytic enzymes, such as MMP, which can destroy the interface tissues and remove osteoid,

thereby promoting osteolysis and providing a surface for osteoclastic bone resorption (2, 4, 28). IL-6 is also implicated in the modulation of bone resorption by the osteoclasts (40). The level of IL-6 was found in synovial fluid to be ten times higher in revision total joint arthroplasties with osteolysis than those without osteolysis (2). There is higher cytokine expression in tissues surrounding cemented prostheses when compared to prostheses without cement (28). The excess synthesis of PGE<sub>2</sub> by interface membranes at the site of aseptic loosening is also one of the factors contributing to osteolysis and the loosening process (31, 41-43).

Our results demonstrated that Tenidap significantly inhibited the expression of several cytokines from 67% up to 90% in therapeutic concentration. The inhibition of TNF- $\alpha$  by Tenidap was between 66.9% and 77.4% ( $p < 0.05$ ) depending on the concentration used and that of IL-1 was between 71% ( $p < 0.05$ ) and 79% ( $p < 0.02$ ). Moreover, the level of IL-6 production was reduced by 90.4% ( $p < 0.005$ ) at the lower Tenidap concentration and by 96.0% ( $p < 0.05$ ) at the higher concentrations. Tenidap also had a marked suppressive effect of over 90% ( $p < 0.0001$ ) on PGE<sub>2</sub> synthesis at all three concentrations used.

Tenidap, a drug from the chemical class of the oxindoles, has been shown to modulate cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) production in synovial membrane of RA patients (20). Tenidap also reduced *in vivo* IL-1 $\beta$  activity in synovial fluid as well as the activity and/or expression of MMP in cartilage in a canine experimental model (44). Tenidap was chosen for this study because of its very potent cytokine synthesis inhibition both *in vivo* (44) and *in vitro* (20). On the other hand, Diclofenac, a NSAID belonging to the arylacetic groups of phenylacetic acid, significantly inhibited the synthesis of PGE<sub>2</sub>, a major factor associated with the pathophysiology and symptoms of osteolysis and implant loosening.

However, no effects were observed on the synthesis of cytokines, which are known to be very important modulators of osteolysis in periprosthetic tissues.

Much of the work to find a pharmacological treatment for aseptic loosening has focused on bisphosphonates and TNF- $\alpha$  antagonists (15, 16, 45, 46). The potential of TNF- $\alpha$  antagonists has already been demonstrated in animal model in osteolysis (16). Thus, the reduction in TNF- $\alpha$  production by Tenidap should have a similar effect on osteolysis prevention. Also, the production of IL-6 and PGE<sub>2</sub> by particle-activated osteoblasts is thought to negatively influence the gene expression of procollagen and favor recruitment of osteoclastic cells (34, 41). The inhibition of PGE<sub>2</sub> observed in this study was not associated to a concomitant decrease in cytokine levels in the diclofenac group. PGE<sub>2</sub> is directly related to IL-6 expression (47). Significantly suppressing PGE<sub>2</sub> by 95% from 0 hour to 72 hours using either drug has most likely downplayed the increased levels of IL-6 found in the culture medium. Nevertheless, a significant inhibition of PGE<sub>2</sub> should have also theoretically decreased IL-6 levels in the diclofenac group, which was not the case. Contrary to diclofenac, tenidap also seemed to have a direct inhibitory effect on IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ , which explains its efficacy even at 72h of incubation compared to PGE<sub>2</sub> inhibition alone. The reduction of IL-6 and PGE<sub>2</sub> secretion by Tenidap could help restore the normal balance between bone formation and bone resorption in implant failure.

The interaction between osteoblasts, macrophages and osteoclasts in aseptic loosening of orthopedic implants is underestimated in the literature. However, accumulating evidence suggests that the osteoblasts play a central role in recruiting and activating cells responsible for bone destruction (1, 3, 41, 42). Modulation not only of proinflammatory

cytokines but also PGE<sub>2</sub> synthesis by pharmacological agents is of prime importance in avoiding orthopedic implant loosening and osteolysis (33, 47, 48).

Our findings suggest a possible role for multiple cytokine inhibition in the treatment/prevention of patients suffering from aseptic loosening. To our knowledge, this is the first time that simultaneous inhibition of multiple cytokines and PG in the interface membrane by a pharmacological agent has been reported. Further studies *in vivo* are necessary to evaluate the simultaneous inhibition of these proinflammatory cytokines in the pathophysiology of implant loosening, as well as its correlation to osteoblastic activity (40). These findings pinpoint specific targets for potential pharmacologic prevention of failed total joint arthroplasties and provide alternatives to surgical treatment.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Ms. Heather Yampolsky for her invaluable assistance in the editing and correction of this manuscript. We would also like to acknowledge the gift of Tenidap made by Pfizer Central Research, Groton, CT, USA

## REFERENCES

1. Maloney WJ, Smith RL, Schmalzried TP, Chiba J, Huene D, Rubash H. Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1301-10.
2. Goodman S, Chin RC, Chiou SS, Schurman DJ, Woolson ST, Masada MP. A clinical pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. *Clin Orthop* 1989;244:182-7.
3. Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M, Hallab NJ, Glant TT. Osteolysis: basic science. *Clin Orthop* 2001;71-7.
4. Dorr LD, Bloebaum R, Emmanuel J, Meldrum R. Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 1990;82-95.
5. Sabokbar A, Fujikawa Y, Neale S, Murray DW, Athanasou NA. Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. *Ann Rheum Dis* 1997;56:414-20.
6. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997;12:869-79.
7. Blaine, T.A.; Pollice, P.F.; Rosier, R.N.; Reynolds, P.R.; Puzas, J.E.; O'Keefe, R.J. Modulation of the production of cytokines in titanium-stimulated human peripheral blood monocytes by pharmacological agents. The role of cAMP-mediated signaling

mechanisms. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 79, n 10, p.1519-28, 1997

8. Shanbhag, A.S.; Hasselmann, C.T.; Rubash, H.E. The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *Clin. Orthop*, v. 344, p. 33-43, 1997.

9. Millet, PJ; Allen, MJ; Bostrom, MP: Effects of alendronate on particle-induced osteolysis in a rat model. *J Bone Joint Surg Am Feb*;84-A(2):236-49, 2002

10. Zhang, X.; Morham, S.G.; Langenbach, R.; Young, D.A.; Xing, L.; Boyce, B.F.; Puzas, E.J.; Rosier, R.N.; O'Keefe, R.J.; Schwartz, E.M. Evidence for a direct role of cyclo-oxygenase 2 in implant wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res*, v. 16, n. 4, p. 660-670, 2001

11. Pelletier JP, Martel-Pelletier J: *In vivo* protective effects of prophylactic treatment with tiaprofenic acid or intra-articular corticosteroids on osteoarthritic lesions in the experimental dog model. *J Rheumatol* 27:127-130, 1991.

12. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Otterness IG, Lopez-Anaya A, Mineau F, Tardif G, Pelletier JP: Effects of tenidap on canine experimental osteoarthritis: I - Morphological and metalloprotease analysis. *Arthritis Rheum* 38:1290-1303, 1995

13. Ratcliffe A, Azzo W, Saed-Nejad F, Lane N, Rosenwasser MP, Mow VC: *In vivo* effects of naproxen on composition proteoglycan metabolism, and matrix metalloproteinase activities in canine articular cartilage. *J Orthop Res* 11:163-171, 1993.

14. Palmoski MJ, Brandt KD: *In vivo* effect of aspirin on canine osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 26:994-1001, 1983.

15. Pollice PF, Rosier RN, Looney RJ, Puzas JE, Schwarz EM, O'Keefe RJ. Oral pentoxifylline inhibits release of tumor necrosis factor-alpha from human peripheral

blood monocytes : a potential treatment for aseptic loosening of total joint components. J Bone Joint Surg Am 2001;83-A:1057-61

16. Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ, Schwarz EM. Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. J Bone Miner Res 2001;16:338-447

17. Moore PF, Larson DL, Otterness IG, Weissman A, Kadin SB, Sweeney FJ, Eskra JD, Nagahisa A, Sakakibar M, Carty TJ: Tenidap, a structurally novel drug for the treatment of arthritis. Antiinflammatory and analgesic activity. Inflamm Res 45, 1996

18. Otterness IG, Carty TJ, Loose LD: Tenidap: A new drug for arthritis. In, Therapeutic approaches to inflammatory diseases. Edited by AJ Lewis, NS Doherty, NR Ackerman NR. New York, Elsevier, 1989

19. Sipe JD, Bartle LM, Loose LD: Modification of proinflammatory cytokine production by the antirheumatic agents tenidap and naproxen. A possible correlation with clinical acute phase response. J Immunol 148:480-484, 1992

20. Ounissi-Benkalha H, Pelletier JP, Tardif G, et al. *In vitro* effects of 2 antirheumatic drugs on the synthesis and expression of proinflammatory cytokines in synovial membranes from patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1996;23:16-23.

21. Littman BH, Drury CE, Stewart CR: Acute phase protein and plasma IL-6 in patients with rheumatoid arthritis: Effects of tenidap and piroxicam in a 12 week double blind crossover study (abstract). Arthritis Rheum (suppl) 36:S-112, 1993.

22. Leeming MRG: A double-blind randomized comparison of tenidap vs auranofin plus diclofenac in early rheumatoid arthritis (RA) (abstract). Arthritis Rheum (suppl) 36:S-111, 1993.

23. Kraska AR, Wilhem FE, Kirby DS, Loose LD, Ting N, Shanahan WR, Weiner ES: Tenidap vs piroxicam vs piroxicam plus hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis (abstract). *Arthritis Rheum (suppl)* 36:S57, 1993.
24. Wylie G, Appelboom T, Bolten W, Breedveld FC, Feely J, Leeming MR, Le Loet X, Manthorpe R, Marcolongo R, Smolen J. A comparative study of tenidap, a cytokine-modulating anti-rheumatic drug, and diclofenac in rheumatoid arthritis: a 24-week analysis of a 1-year clinical trial. *Br J Rheumatol.* 1995 Jun;34(6):554-63.
25. Benigni F, Fantuzzi G, Sacco S, Sironi M, Pozzi P, Dinarello CA, Sipe JD, Poli V, Cappelletti M, Paonessa G, Pennica D, Panayotatos N, Ghezzi P. : Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood.* 1996 Mar 1;87(5):1851-4.
26. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR et al, Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75: 863-79
27. Kim KJ, Chiba J, Rubash HE. In vivo and in vitro analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 172-80
28. Kim KJ, Rubash HE, Wilson SC, D'Antonio JA, McClain EJ. A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses. *Clin Orthop* 1993;287:142-52.
29. Gruen TA, McNiece GM, Amstutz HC. 'modes of failure' of cemented stem-type

- femoral components: a radiographic analysis of loosening. *Clin Orthop* 1979; 141: 17-27
30. Caldwell JR, Kirby DS, Gardner MJ, Hansen RA. The effects of age and gender on the pharmacokinetics of tenidap sodium in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39 Suppl 1:3S-9S.
31. Fowler PD, Shadforth MF, Crook PR, John VA. Plasma and synovial fluid concentrations of Diclofenac sodium and its major hydroxylated metabolites during long-term treatment of rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol* 1983;25:389-94.
32. Pelletier JP, Caron JP, Evans CH, Robbins PD, Georgescu HI, Jovanovic D et al. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by IL-1Ra using gene therapy. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1012-19.
33. Shi Q, Lajeunesse D, Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Dehnade F et al. Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic trabecular bone in failed total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. *J Rheumatol* 2002; 29: 1437-45.
34. Dean DD, Schwartz Z, Blanchard CR, et al. Ultrahigh molecular weight polyethylene particles have direct effects on proliferation, differentiation, and local factor production of MG63 osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 1999;17:9-17.
35. Schwartz EM, Lu AP, Goater JJ, Benz EB, Kollias G, Rosier RN et al. Tumor necrosis factor alpha/nuclear transcription factor-kappaB signalling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 2000;18: 472-80.

36. Fuller, K.; Murphy, C.; Kirstein, B.; Fox, S.W.; Chambers, T.J. TNF-alpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology*, v. 143, n. 3, p.1108-1118, 2002
37. Clohisy, J.C.; Teitlebaum, S.; Chen, S.; Erdmann, J.M.; Abu-Amer, Y. Tumor necrosis factor-alpha mediates polymethylmethacrylate particle-induced NF-kappaB activation in osteoclast precursor cells. *J. Orthop. Res.*, v. 20, n. 2, p. 174-181, 2002.
38. Lee SH, Brennan FR, Jacobs JJ, Urban RM, Ragasa DR, Glant TT. Human monocyte/macrophage response to cobalt-chromium corrosion products and titanium particles in patients with total joint replacements. *J Orthop Res* 1997;15:40-9.
39. Stea S, Visentin M, Granchi D, et al. Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine* 2000;12:1575-9.
40. Vargas SJ, Naprta A, Glaccum M, Lee SK, Kalinowski J, Lorenzo JA. Interleukin-6 expression and histomorphometry of bones from mice deficient in receptors for interleukin-1 or tumor necrosis factor. *J Bone Miner Res* 1996;11:1736-44.
41. Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KA, Glant TT. The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:201-11.
42. Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Life Sci* 1999;65:1087-102.
43. Lader CS, Flanagan AM. Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro.

Endocrinology 1998;139:3157-64.

44. Fernandes JC, Caron JP, Martel-Pelletier J, et al. Effects of tenidap on the progression of osteoarthritic lesions in a canine experimental model: Suppression of metalloprotease and IL-1 activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:284-94.

45. Leung A, Scammell B, Lyons A, et al. Alendronate prevents periprosthetic bone loss - 2 year results. *Arthritis and Rheumatism* 1999;42 (supp):S270.

46. Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ, Schwarz EM. Effect of anti-tumor necrosis factor-alpha gene therapy on wear debris-induced osteolysis. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:1789-97.

47. Kozawa, O.; Suzuki, A.; Tokuda, H.; Kaida, T.; Uematsu, T Interleukin-6 synthesis induced by prostaglandin E2: cross-talk regulation by protein kinase C. *Bone*, Apr., v. 22, n. 4, p. 355-60, 1998.

48. Armstrong S, Read R, Gosh P. The effect of intra-articular hyaluronan on cartilage and subchondral bone changes in an ovine model of early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 680-8.

*FIGURE LEGENDS*

**Figure 1.** Levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in the culture medium of interface membrane explants. Failed total hip replacement (fTHR) interface membranes were retrieved at the time of revision surgery (n = 20) and explants were done as described in Patients and Methods. The levels of IL-1 $\beta$  were determined in the culture medium using specific solid-phase, double antibody ELISA. Each assay was performed in duplicate. Explants from fTHR treated with Tenidap had a significant decrease in IL-1 $\beta$  levels compared to untreated controls. There was no significant decrease in IL-1 levels in the Diclofenac-treated group when compared to untreated controls. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM and statistical analysis was done by two-tailed Mann-Whitney u-test.

**Figure 2.** Levels of interleukin-6 (IL-6) in the culture medium of interface membrane explants. Failed total hip replacement (fTHR) interface membranes were retrieved at the time of revision surgery (n = 20) and explants were done as described in Patients and Methods. The levels of IL-6 were determined in the culture medium using specific solid-phase, double antibody ELISA. Each assay was performed in duplicate. There was no significant decrease in IL-6 levels in the Diclofenac-treated group when compared to untreated controls. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM and statistical analysis was done by two-tailed Mann-Whitney u-test.

**Figure 3.** Levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the culture medium of interface membrane explants. Failed total hip replacement (fTHR) interface membranes were retrieved at the time of revision surgery (n = 20) and explants were done as described in Patients and Methods. The levels of TNF- $\alpha$  were determined in the culture

medium using specific solid-phase, double antibody ELISA (high sensitivity) (R&D Systems Minneapolis, MN, USA). Each assay was performed in duplicate. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM and statistical analysis was done by two-tailed Mann-Whitney u-test.

**Figure 4.** Level of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in the culture medium interface membrane explants. Failed total hip replacement (fTHR) interface membranes were retrieved at the time of revision surgery (n = 20) and explants were done as described in Patients and Methods. The amount of PGE<sub>2</sub> was assessed in the medium by use of a PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay kit. Assays were performed in duplicate. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM and statistical analysis was done by two-tailed Mann-Whitney u-test.

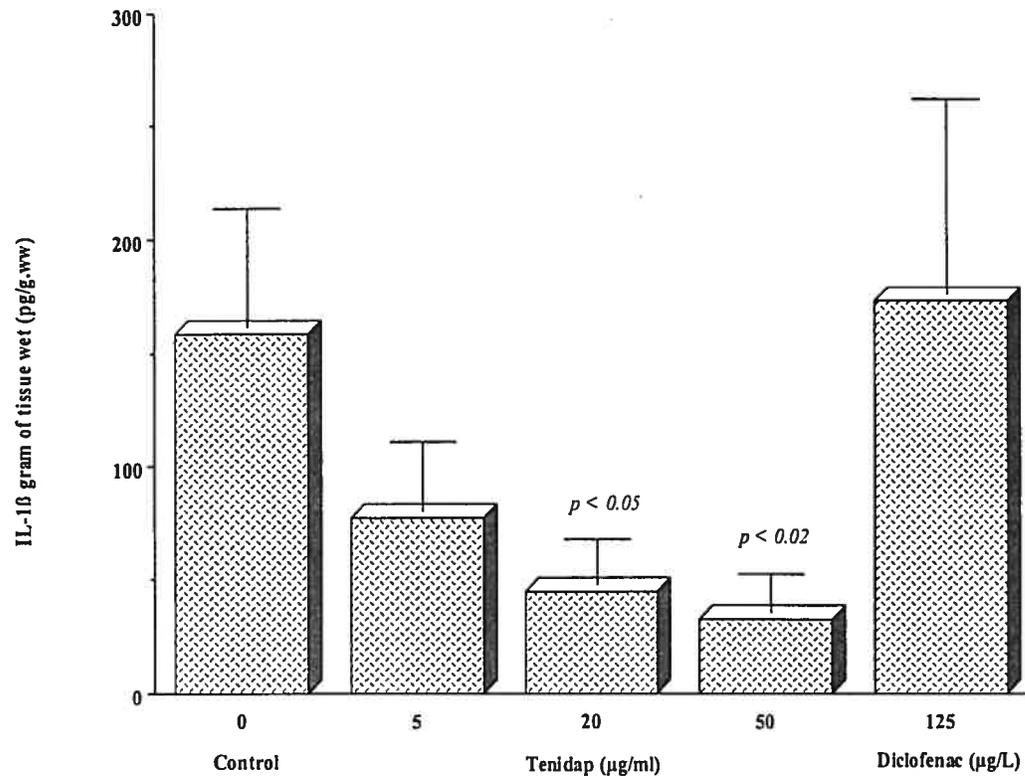
Table I: Patients characteristics and type of failure.

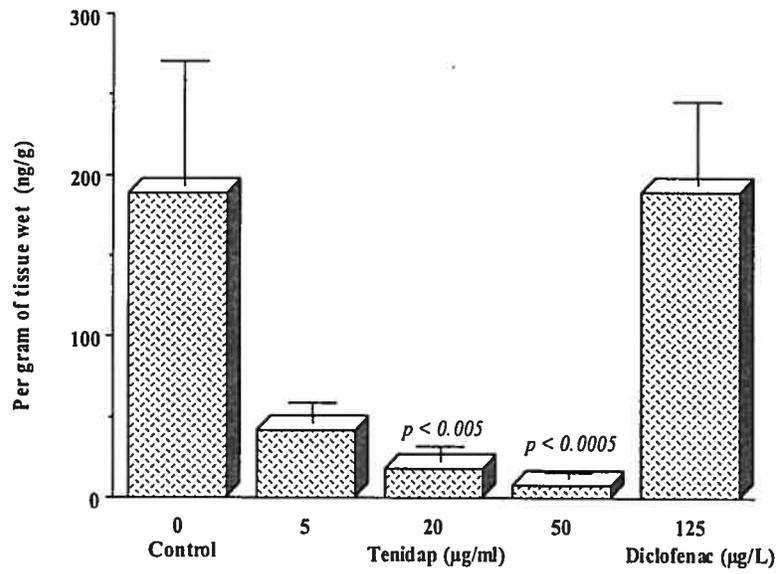
Age/ Sex	*fTHR – cavitory osteolysis		fTHR – linear osteolysis		
	Months to failure	Type of revision	Age / Sex	Months to failure	Type of revision
75/ F	34	Cavitory osteolysis	71/F	34	THR dislocation/
79/ F	86	Cavitory osteolysis	78/F	118	Linear osteolysis
77/ M	54	Massive linear/ cavitory osteolysis	68/M	62	Linear osteolysis
68/ F	40	Massive cavitory osteolysis/ femoral fx**	42/F	38	Linear osteolysis / periprosthetic fx
63/ F	64	Linear/ cavitory osteolysis	62/M	49	Linear osteolysis / periprosthetic fx
59/ M	49	Massive cavitory osteolysis	59/M	41	Massive liner wear/
79/ F	86	Cavitory osteolysis	79/M	119	Linear osteolysis
71/ M	64	Linear/ cavitory osteolysis	61/M	49	Linear osteolysis
74/ M	44	Linear/ cavitory osteolysis	72/M	39	Linear osteolysis/fx
58/ M	49	Massive cavitory osteolysis	69/M	41	Linear osteolysis

All patients had a diagnosis of hip osteoarthritis at the time of the primary total hip replacement. Only failed hybrid THR with metal on UHMWPE bearings were included in the study to standardize patient selection.

\*fTHR: Failed total hip replacement

\*\*Fx: Fracture

**Figure 1: In vitro effect of Tenidap and Diclofenac on the level of IL-1 $\beta$** 

**Figure 2: In vitro effect of Tenidap and Diclofenac on the level of IL-6**

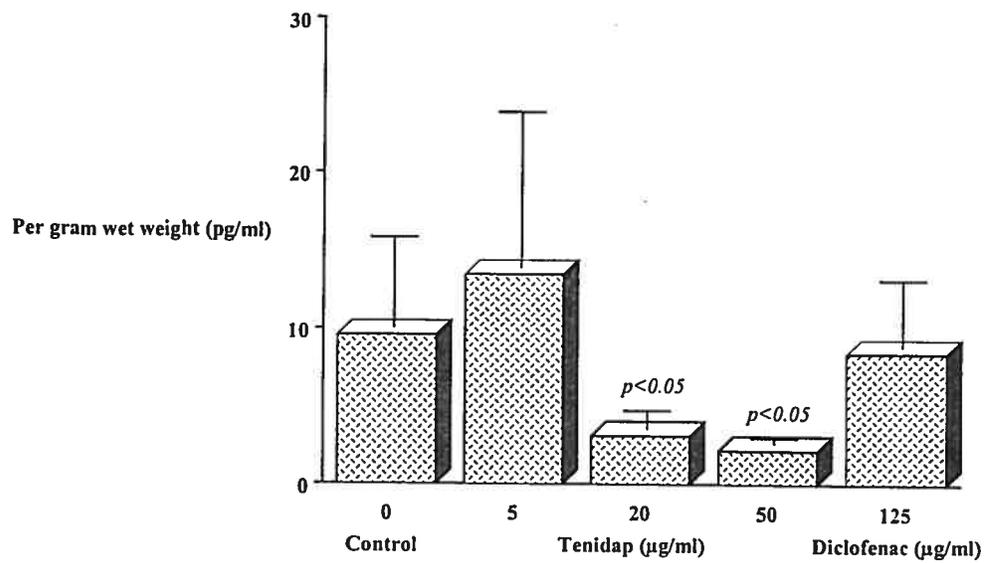
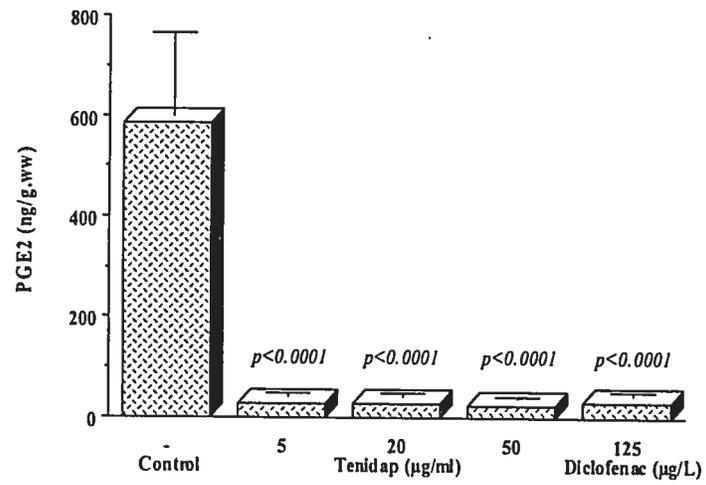
**Figure 3: In vitro effect of Tenidap and Diclofenac on the level of TNF- $\alpha$** 

Figure 4 In vitro effect of tenidap and Diclofenac on the level of PGE2



## CHAPTIRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'arthroplastie permet de redonner une fonction acceptable aux patients avec arthrose avancée autrement confinés à un périmètre de marche restreint et à des capacités fonctionnelles diminuées. Bien que dispendieux et relativement durable, le remplacement articulaire comporte un problème majeur tel qu'expliqué en détail dans les pages précédentes : l'ostéolyse périprothétique.

Les stratégies de prévention de l'ostéolyse portant sur l'amélioration des matériaux utilisés dans le but de réduire la charge de particules produites n'ont pas donné de résultats à long terme jusqu'ici. L'amélioration du polyéthylène reste à être démontrée et l'introduction de la céramique, bien que réduisant la charge de particules produite, pose un problème différent puisque la tête de la composante est plus friable et présente un risque de fracture. L'utilisation des couples métal/métal améliorés par l'application d'une couche d'azote ou le polissage de la tête de l'implant permettent une surface aussi lisse que la céramique et constituent une solution possible à la diminution de la production de débris mais ce type d'implant n'a pas encore eu l'approbation des agences fédérales.

Des études *in vitro* et des modèles animaux ont été développés pour tenter de réduire la réponse inflammatoire par des médicaments dans les cas d'ostéolyse. Une étude *in vitro* reproduisant un modèle d'ostéolyse et voulant comparer l'effet de l'indométacine, d'anticorps anti-TNF- $\alpha$  et du pamidronate sur la production de PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  et la relâche de calcium (marqueur de la résorption osseuse) a montré qu'aucun

de ces médicaments par lui-même est efficace dans la diminution simultanée du TNF- $\alpha$ , du PGE<sub>2</sub> et du calcium. L'indométacine inhibe PGE<sub>2</sub> mais n'affecte pas la production de TNF- $\alpha$  ni celle du calcium. Par contre, les anticorps contre TNF- $\alpha$  ont l'effet contraire, n'affectant pas la production de PGE<sub>2</sub> ni celle du calcium. Toutefois, l'ajout de pamidronate en combinaison permettrait la diminution de la production de calcium, indiquant une diminution de la résorption osseuse (Horowitz SM et al, 1996).

Le pamidronate est un médicament de la classe des biphosphonates dont l'indication principale est la prévention de l'ostéoporose. Cette classe de médicament inhibe l'activité des ostéoclastes. Dans une étude clinique non randomisée voulant vérifier l'effet de l'alendronate, un biphosphonate, dans la prévention de l'ostéolyse périprothétique, les résultats ont montré une diminution de la perte osseuse précocement. Les auteurs ont cependant précisé que la perte osseuse dans les premières années est probablement secondaire à l'effet de « stress-shielding » et non à l'ostéolyse causée par les débris puisque les patients en attente de chirurgie pour une révision de prothèse ayant leur prothèse en place depuis plus de cinq ans n'ont pas montré d'augmentation de la masse osseuse sous l'alendronate (Leung A et al, 1999).

Les biphosphonates ont été étudiés dans un modèle de déscollement de prothèse chez le chien et les auteurs ont montré une diminution de la fréquence de l'apparition de changements ostéolytiques sur des radiographies malgré la persistance *in vivo* de niveaux élevés de cytokines (Shanbhag AS et al, 1997). Cette classe de médicament présente certes un potentiel dans le traitement de l'ostéolyse périprothétique mais les études chez

l'humain ne sont pas concluantes. Les biphosphonates semblent utiles pour prévenir la perte de masse osseuse non médiée par un processus inflammatoire.

Une autre classe de médicaments avec un effet potentiel sur l'ostéolyse périprothétique sont les inhibiteurs de TNF- $\alpha$  (etanercept et infliximab). Cette classe de médicaments est approuvée pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et on a démontré qu'ils ont le potentiel d'inhiber l'érosion osseuse dans cette maladie (Lipski P et al, 1999; Finck B et al, 1999) et dans des modèles animaux d'ostéolyse induite par les débris (Clohisy JC et al, 1999; Chuils LM et al, 1999). Ces médicaments sont très prometteurs pour la prévention de l'ostéolyse mais sont aussi extrêmement dispendieux. L'efficacité *in vivo* doit cependant être démontré par des études cliniques.

Une dernière classe de médicaments, encore au stade expérimental, regroupe les molécules qui interagissent avec le complexe RANK/RANKL. Les études animales montrent que les protéines recombinantes de RANK soluble ont la capacité d'inhiber l'ostéolyse induite par les débris sans toutefois affecter l'inflammation (Chuils LM et al, 1999).

Le but principal de ce travail dans le contexte d'un mémoire était dans un premier temps de caractériser la réponse des ostéoblastes humains de patients OA lorsque soumis *in vitro* à un stress inflammatoire comparable à celui que subit la cellule *in vivo* dans un cas de déscollement de prothèse initié par les débris. Nous voulions en particulier évaluer le potentiel proinflammatoire du PMMA dans cette situation.

Il existait déjà beaucoup d'informations en ce qui a trait aux cytokines produites par les macrophages en présence de ciment et à leur action finale sur l'os. Par contre, l'étude du profil métabolique de l'Ob en terme de marqueurs d'activité de résorption et de formation osseuse est relativement nouvelle. Certes la réponse inflammatoire des macrophages aux débris de PMMA et leurs effets sur la prolifération des macrophages sont décrits (Horowitz SM et al, 1991; Gelb H et al, 1994; Dorr LD et al, 1990; Callaghan JJ et al, 1985; Trindade MCD et al, 2001; Ingham E et al, 2000), mais très peu d'études sur les ostéoblastes sont rapportés dans la littérature et encore moins sur des ostéoblastes humains. Zambonin et al (1998) avait déjà démontré une diminution de la prolifération, une diminution de la synthèse de collagène et une augmentation de la production de IL-6 et d'ostéocalcine lorsque des ostéoblastes humains sont mis en présence de débris de ciment. Un second article (Granchi D et al, 2002) utilisant une lignée d'ostéoblaste immortalisée (MG63) a aussi démontré une modulation du ratio OPG/OPG-L par les particules de ciment de façon à favoriser la résorption osseuse. Toujours sur les cellules MG63, Lohmann et al (2002) a démontré entre autre une augmentation de PGE<sub>2</sub> en présence de particules de ciment ainsi qu'un effet positif sur la prolifération cellulaire (contrairement à l'effet négatif démontré par Zambonin sur des Ob humains).

Les résultats présentés dans cette étude apportent donc de nouvelles connaissances sur un sujet mal décrit dans la littérature actuelle. Non seulement nous décrivons la réponse inflammatoire engendrée par le PMMA sur des Ob humains, nous sommes aussi capables d'évaluer l'ampleur de cette réponse en comparant avec l'effet des autres cytokines importantes dans le déscollement de prothèse. De plus, nous avons mis en

évidence la présence de deux populations différentes d'Ob selon qu'ils produisent de façon plus ou moins importante IL-6 et PGE<sub>2</sub>. Nous croyons que le groupe de patients dont les Ob produisent fortement ces deux médiateurs sont plus à risque pour l'ostéolyse périprothétique de par un débalancement de leur activité métabolique en faveur de la formation de médiateurs d'activité catabolique au détriment de l'activité anabolique. La signification *in vivo* de cette observation reste cependant à être démontrée dans le contexte de l'ostéolyse en confirmant que le groupe produisant fortement IL-6 et PGE<sub>2</sub> progresse plus rapidement vers l'ostéolyse causant alors un rejet précoce de l'implant.

Nous avons donc été en mesure de démontrer un effet double du PMMA sur l'Ob en augmentant la production de médiateurs de résorption osseuse et en diminuant la production de médiateurs de formation osseuse. L'action du ciment dans cette étude est comparable à celui de TNF- $\alpha$  qui est reconnu dans la littérature comme la cytokine pivot de la cascade inflammatoire. Étant donné son potentiel inflammatoire important et une action cytotoxique directe sur les cellules par le solvant qu'il contient et par la chaleur dégagée lors de la réaction de polymérisation per-opératoire, cette découverte démontre en fait que le PMMA exerce un rôle très important dans la pathophysiologie du déscellement d'implant. Mieux comprendre l'effet du ciment dans ce contexte permet d'ouvrir la voie à de nouvelles recherches portant sur la confection d'un matériau utilisable pour la fixation de l'implant à l'os avec les propriétés idéales pour la survie de l'Ob et la minimisation de la réponse inflammatoire.

La seconde portion de ce travail visait à comparer l'efficacité de deux agents pharmacologiques, soit le Tenidap et le Diclofenac dans l'inhibition de la réponse inflammatoire dans un contexte de déscollement de prothèse. La réponse inflammatoire menant à l'ostéolyse périprothétique est principalement liée à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires en réponse au contact des Ob et macrophages avec les particules générées par les composantes d'implant. L'hypothèse principale dans ce contexte est que l'inhibition complète de cette réponse par un agent pharmacologique pourrait permettre le ralentissement voir même la prévention de l'ostéolyse et donc une survie accrue pour l'implant, avec les bénéfices pour le patient et la société. Parmi les médiateurs les plus importants dans ce processus on retrouve les prostaglandines ( $PGE_2$  principalement) et les cytokines. Notre étude a permis de démontrer que le Tenidap avait le potentiel pour inhiber simultanément ces deux voies métaboliques en utilisant des explants de membranes provenant de patients ayant un déscollement de prothèse. Jusqu'ici, aucune étude n'avait démontré une inhibition de ces deux voies métaboliques simultanément dans ce contexte. L'attrait de cette étude est donc qu'elle apporte une solution possible et déjà disponible pour diminuer ou prévenir le phénomène d'ostéolyse. Le profil d'action du Tenidap est déjà connu et il s'agit d'un médicament sécuritaire et facilement administrable. Des études cliniques sont cependant nécessaires pour confirmer le potentiel du Tenidap dans la prévention du déscollement d'implant. De plus, la mise en évidence du rôle important du PMMA dans l'ostéolyse périprothétique confirme la nécessité d'améliorer les techniques de fixation de l'implant à l'os. La diminution du potentiel inflammatoire du PMMA sur les Ob et macrophages pourrait permettre de prolonger la durée de vie utile des implants.

## **CHAPITRE 6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES**

Malgré les connaissances de plus en plus approfondies sur le processus ostéolytique dans le déscollement de prothèse, il n'existe malheureusement aucun traitement définitif pour cette pathologie. Présentement, seule la chirurgie de révision de prothèse offre une amélioration de la fonction et une diminution de la douleur à long terme. Diverses stratégies pour la prévention de l'ostéolyse sont présentement à l'étude. L'amélioration des implants par l'utilisation de matériaux à potentiel inflammatoire moindre ainsi que par l'amélioration des dessins de prothèse actuellement sur le marché ne préviendront pas complètement l'apparition de l'ostéolyse puisque des débris continueront, bien qu'à un degré moindre, d'être produits. Ces améliorations visent pour le moment à accroître la durée de vie de l'implant et non à régler le problème. La combinaison de ces implants améliorés avec de nouvelles classes de molécules ayant un effet d'inhibition sur la perte osseuse au pourtour de l'implant pourrait s'avérer très utile pour éliminer le phénomène d'ostéolyse résiduel.

### **6.1 PERSPECTIVES**

Les recherches pour trouver une façon de réduire le phénomène d'ostéolyse périprothétique vont bon train. Deux approches sont possibles et se veulent selon moi complémentaires. La première consiste à améliorer les matériaux existants de façon à minimiser la charge de débris produite au fil des années. La seconde approche vise à inhiber pharmacologiquement la réponse inflammatoire engendrée par les particules

présentes *in vivo*. Aucune étude clinique ne s'est malheureusement montrée probante dans l'étude de la prévention de l'ostéolyse périprosthétique. Les récentes découvertes, en particulier celles portant sur le complexe RANKL/RANK, pourrait toutefois permettre la mise au point d'un médicament efficace sous peu.

La mise en évidence de groupes de patients plus à risque pourrait justifier l'emploi de médicaments en prévention du phénomène d'ostéolyse. Ces médicaments pourraient être libérés localement par leur ajout au ciment ou être administrés par voie orale. Plus encore, il pourrait être justifié, même dans un système de santé avec un financement limité comme le nôtre, d'offrir aux patients plus à risque une prothèse faite sur mesure malgré son prix exorbitant, le tout combiné avec un régime médicamenteux dans le but de prévenir ou de ralentir le processus d'ostéolyse. Vu les coûts économiques et sociaux importants d'une chirurgie de révision, la prévention prend toute son importance surtout dans l'optique de l'identification d'un groupe de patients potentiellement à risque.

D'ici là, grâce à l'éclaircissement du potentiel inflammatoire du PMMA et à la découverte de la double inhibition des cytokines et prostaglandines par de nouvelles molécules telles le Tenidap, les recherches portant sur l'amélioration du ciment et des études animales visant à vérifier l'efficacité des inhibiteurs de cytokines dans la prévention de l'ostéolyse pourraient être entreprises à la lumière des résultats rapportés dans ce mémoire.

## RÉFÉRENCES

Adebanjo OA, Moonga BS, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E, Zaidi M: Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 142:1347-1356, 1998

Ahnfelt L, Herberts P, Malchau H, Andersson GB: Prognosis of total hip replacement. A Swedish multicenter study of 4,664 revisions. *Acta Orthop Scand Suppl* 238:1-26, 1990

Al Saffar N, Revell PA: Interleukin-1 production by activated macrophages surrounding loosened orthopaedic implants: a potential role in osteolysis. *Br J Rheumatol* 33:309-316, 1994

Aubin JE, Bonnelye E: Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Medscape Womens Health* 5:5, 2000

Benigni F, Fantuzzi G, Sacco S, Sironi M, Pozzi P, Dinarello CA, Sipe JD, Poli V, Cappelletti M, Paonessa G, Pennica D, Panayotatos N, Ghezzi P: Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* 87:1851-1854, 1996

Blaine TA, Rosier RN, Puzas JE, Looney RJ, Reynolds PR, Reynolds SD, O'Keefe RJ: Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles. *J Bone Joint Surg Am* 78:1181-1192, 1996

Blaine TA, Pollice PF, Rosier RN, Reynolds PR, Puzas JE, O'Keefe RJ: Modulation of the production of cytokines in titanium-stimulated human peripheral blood monocytes by pharmacological agents. The role of cAMP-mediated signaling mechanisms. *J Bone Joint Surg Am* 79:1519-1528, 1997

Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol* 277:F157-F175, 1999

Callaghan JJ, Salvati EA, Pellicci PM, Wilson PD, Jr., Ranawat CS: Results of revision for mechanical failure after cemented total hip replacement, 1979 to 1982. A two to five-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 67:1074-1085, 1985

Callaghan JJ, Forest EE, Olejniczak JP, Goetz DD, Johnston RC: Charnley total hip arthroplasty in patients less than fifty years old. A twenty to twenty-five-year follow-up note. *J Bone Joint Surg Am* 80:704-714, 1998

Catelas I, Huk OL, Petit A, Zukor DJ, Marchand R, Yahia L: Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition. *J Biomed Mater Res* 41:600-607, 1998

Chan TH: Orthopaedics: Device segments and markets. *Financial Times, Pharmaceuticals and Healthcare Publishing*, Rank Xerox LTD, Remax House, London, 1997

Charnley J: Total prosthesis replacement of the hip. *Reconstr Surg Traumatol* 11: 9-19, 1969

Childs LM, Goater JJ, Sanz I : Efficacy of the soluble TNF-a inhibitor (Enbrel) to prevent prosthetic wear debris-induced osteolysis. *Arthritis Rheum* 42 (suppl): S154, 1999

Clarke IC, Good V, Anissian L, Gustafson A: Charnley wear model for validation of hip simulators--ball diameter versus polytetrafluoroethylene and polyethylene wear. *Proc Inst Mech Eng [H]* 211:25-36, 1997

Clohisy JC, Teitlebaum SL, Ross FP: Blockade of TNF-activation of NF-kB in osteoclasts precursors prevents implant osteolysis. *J Bone Miner Res* 14 (suppl): S489, 1999

Dean DD, Schwartz Z, Liu Y, Blanchard CR, Agrawal CM, Mabrey JD, Sylvia VL, Lohmann CH, Boyan BD: The effect of ultra-high molecular weight polyethylene wear debris on MG63 osteosarcoma cells in vitro. *J Bone Joint Surg Am* 81:452-461, 1999

Doom PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC: Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *J Biomed Mater Res* 42:103-111, 1998

Dorr LD, Takei GK, Conaty JP: Total hip arthroplasties in patients less than forty-five years old. *J Bone Joint Surg Am* 65:474-479, 1983

Dorr LD, Bloebaum R, Emmanuel J, Meldrum R: Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 82-95, 1990

Dorr LD, Lockett M, Conaty JP. Total hip arthroplasties in patients less than forty-five years old: a nine- to ten-year follow-up study. *Clin Orthop* 260:215-219, 1990

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G: *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754, 1997

Endler F: Einführung in die Biomechanik und Biotechnik des Bewegungsapparates. In: Witt AN, Rettig H, Schlegel KF, Hackenbroch M, Hupfauer W (ed): *Orthopädie in Praxis und Klinik*. 2 edition, Thieme, Stuttgart, New York, 1981

Emery DF, Clarke HJ, Grover ML: Stanmore total hip replacement in younger patients: review of a group of patients under 50 years of age at operation. *J Bone Joint Surg Br* 79:240-246, 1997

Espehaug B, Havelin LI, Engesaeter LB, Langeland N, Vollset SE: Patient-related risk factors for early revision of total hip replacements. A population register-based case-control study of 674 revised hips. *Acta Orthop Scand* 68:207-215, 1997

Espehaug B, Havelin LI, Engesaeter LB, Vollset SE: The effect of hospital-type and operating volume on the survival of hip replacements. A review of 39,505 primary total hip replacements reported to the Norwegian Arthroplasty Register, 1988-1996. *Acta Orthop Scand* 70:12-18, 1999

Fabroni RH, Castagno A, Aguilera AL, Steverlynck AM, Zeballos J: Long-term results of limb salvage with the Fabroni custom made endoprosthesis. *Clin Orthop* 41-52, 1999

Fender D, Harper WM, Gregg PJ: Outcome of Charnley total hip replacement across a single health region in England: the results at five years from a regional hip register. *J Bone Joint Surg Br* 81:577-581, 1999

Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., Jovanovic, D., Tardif, G., DiBattista, J.A., Lascau-Coman, V., Otterness, I.G., Pelletier, J.P.: Effects of tenidap on canine experimental osteoarthritis: II Study of the expression of collagenase-1 and IL-1 $\beta$  by *in situ* hybridization. *J. Rheumatol.* 25:951-958, 1998.

Finck B, Martin R, Fleischmann R, Moreland L: A phase III trial of etanercept vs methotrexate in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42 (suppl): S117

Fritz EA, Glant TT, Vermes C, Jacobs JJ, Roebuck KA: Titanium particles induce the immediate early stress responsive chemokines IL-8 and MCP-1 in osteoblasts. *J Orthop Res* 20:490-498, 2002

Garellick G, Malchau H, Herberts P, Hansson E, Axelsson H, Hansson T: Life expectancy and cost utility after total hip replacement. *Clin Orthop* 141-151, 1998

Gelb H, Schumacher HR, Cuckler J, Ducheyne P, Baker DG: In vivo inflammatory response to polymethylmethacrylate particulate debris: effect of size, morphology, and surface area. *J Orthop Res* 12:83-92, 1994

Gierse H, Maaz B, Wessoloski T: Hüft-Endoprothetik. Eine Standortbestimmung. *Deutsches Ärzteblatt* 89 (42), 1992

Glant TT, Jacobs JJ, Molnar G, Shanbhag AS, Valyon M, Galante JO: Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages. *J Bone Miner Res* 8:1071-1079, 1993

Glant TT, Jacobs JJ: Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. *J Orthop Res* 12:720-731, 1994

Goldring SR, Jasty M, Roelke MS, Rourke CM, Bringhurst FR, Harris WH: Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface. Its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement. *Arthritis Rheum* 29:836-842, 1986

Goodman SB, Chin RC, Chiou SS, Schurman DJ, Woolson ST, Masada MP: A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. *Clin Orthop* 182-187, 1989

Granchi D, Cenni E, Savarino L, Ciapetti G, Forbicini G, Vancini M, Maini C, Baldini N, Giunti A: Bone cement extracts modulate the osteoprotegerin/osteoprotegerin-ligand expression in MG63 osteoblast-like cells. *Biomaterials* 23:2359-2365, 2002

Grande JP, Melder DC, Zinsmeister AR: Modulation of collagen gene expression by cytokines: stimulatory effect of transforming growth factor-beta1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV. *J Lab Clin Med* 130:476-486, 1997

Hanssen AD, Rand JA: A comparison of primary and revision total knee arthroplasty using the kinematic stabilizer prosthesis. *J Bone Joint Surg Am* 70:491-499, 1988

Harris WH, Schiller AL, Scholler JM, Freiberg RA, Scott R: Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* 58:612-618, 1976

Harris WH: The problem is osteolysis. *Clin Orthop* 46-53, 1995

Harrison TR: Principes de medicine interne. 5<sup>e</sup> édition française, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris 1992

Havelin LI, Espehaug B, Vollset SE, Engesaeter LB: The effect of the type of cement on early revision of Charnley total hip prostheses. A review of eight thousand five hundred and seventy-nine primary arthroplasties from the Norwegian Arthroplasty Register. *J Bone Joint Surg Am* 77:1543-1550, 1995

Havelin LI, Espehaug B, Vollset SE, Engesaeter LB: Early aseptic loosening of uncemented femoral components in primary total hip replacement. A review based on the Norwegian Arthroplasty Register. *J Bone Joint Surg Br* 77:11-17, 1995

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S: Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140:4382-4389, 1999

Horowitz SM, Gauth T, Frondoza CM, Riley L. Macrophages exposure to polyméthylmétacrylate leads to mediator release and injury. *J Orthop Res* 6:406-413, 1991

Horowitz SM, Doty SB, Lane JM, Burstein AH: Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. *J Bone Joint Surg Am* 75:802-813, 1993

Horowitz SM, Algan SA, Purdon MA: Pharmacologic inhibition of particulate-induced bone resorption. *J Biomed Mater Res* 31:91-96, 1996

- Hozack WJ, Rothman RH, Booth RE, Jr., Balderston RA, Cohn JC, Pickens GT: Survivorship analysis of 1,041 Charnley total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* 5:41-47, 1990
- Huddleston HD: Femoral lysis after cemented THA. *J Arthroplasty* 3:285 1988
- Ingham E, Green TR, Stone MH, Kowalski R, Watkins N, Fisher J: Production of TNF-alpha and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles. *Biomaterials* 21:1005-1013, 2000
- Jasty M, Goetz DD, Bragdon CR, Lee KR, Hanson AE, Elder JR, Harris WH: Wear of polyethylene acetabular components in total hip arthroplasty. An analysis of one hundred and twenty-eight components retrieved at autopsy or revision operations. *J Bone Joint Surg Am* 79:349-358, 1997
- Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC: Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257:88-91, 1992
- Jones LC, Hungerford DS: Cement disease. *Clin Orthop* 192-206, 1987
- Kadoya Y, Revell PA, Al Saffar N, Kobayashi A, Scott G, Freeman MA: Bone formation and bone resorption in failed total joint arthroplasties: histomorphometric analysis with histochemical and immunohistochemical technique. *J Orthop Res* 14:473-482, 1996

Kim YH, Kim JS, Cho SH: Primary total hip arthroplasty with a cementless porous-coated anatomic total hip prosthesis: 10- to 12-year results of prospective and consecutive series. *J Arthroplasty* 14:538-548, 1999

Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R: Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem* 271:28890-28897, 1996

Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S: Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta* 1445:134-141, 1999

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T: Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764, 1997

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveiras-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315-323, 1999

Kurtz SM, Pruitt L, Jewett CW, Crawford RP, Crane DJ, Edidin AA: The yielding, plastic flow, and fracture behavior of ultra-high molecular weight polyethylene used in total joint replacements. *Biomaterials* 19:1989-2003, 1998

Lader CS, Flanagan AM: Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 139:3157-3164, 1998

Lee SK, Lorenzo JA: Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140:3552-3561, 1999

Leung A, Scammel B, Lyons A: Alendronate prevents periprosthetic bone loss – 2 year results. *Arthritis Rheum* 42 (suppl): S270, 1999

Lipski P, St. Clair W, Furst D: 54-week clinical and radiographic results from the attract trial: A phase III study of infliximab in patients with active RA despite methotrexate. *Arthritis Rheum* 42 (suppl): S401, 1999

Littman BH, Drury CE, Stewart CR: Acute phase protein and plasma IL-6 in patients with rheumatoid arthritis: Effect of Tenidap and piroxicam in a 12-week double blind cross-over study. *Arthritis Rheum* 36: S-112 (abstract), 1993

Lohmann CH, Dean DD, Koster G, Casasola D, Buchhorn GH, Fink U, Schwartz Z, Boyan BD: Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblasts phenotype. *Biomaterials* 23: 1855-1863, 2002

Malchau H, Herberts P, Ahnfelt L: Prognosis of total hip replacement in Sweden. Follow-up of 92,675 operations performed 1978-1990. *Acta Orthop Scand* 64:497-506, 1993

Maloney WJ, Jasty M, Harris WH, Galante JO, Callaghan JJ: Endosteal erosion in association with stable uncemented femoral components. *J Bone Joint Surg Am* 72:1025-1034, 1990

Maloney WJ, Smith RL, Schmalzried TP, Chiba J, Huene D, Rubash H: Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J Bone Joint Surg Am* 77:1301-1310, 1995

Margevicius KJ, Bauer TW, McMahon JT, Brown SA, Merritt K: Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J Bone Joint Surg Am* 76:1664-1675, 1994

Martell JM, Pierson RH, III, Jacobs JJ, Rosenberg AG, Maley M, Galante JO: Primary total hip reconstruction with a titanium fiber-coated prosthesis inserted without cement. *J Bone Joint Surg Am* 75:554-571, 1993

Mauviel A, Lapiere JC, Halcin C, Evans CH, Uitto J: Differential cytokine regulation of type I and type VII collagen gene expression in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 269:25-28, 1994

Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP, Abu-Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL: Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol* 154:203-210, 1999

Moore PF, Larson DL, Otterness IG, Weissman A, Kadin SB, Sweeney FJ, Eskra JD, Nagahisa A, Sakakibara M, Carty TJ: Tenidap, a structurally novel drug for the treatment of arthritis: antiinflammatory and analgesic properties. *Inflamm Res* 45:54-61, 1996

Nakashima Y, Sun DH, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL: Induction of matrix metalloproteinase expression in human macrophages by orthopaedic particulate debris in vitro. *J Bone Joint Surg Br* 80:694-700, 1998

O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC: STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem* 274:19301-19308, 1999

Ottenness IG, Carty TJ, Loose LD: Tenidap: A new drug for arthritis. In: Lewis AJ, Doherty NS, Ackerman NR, eds: *Therapeutic approaches to inflammatory diseases*, New York, Elsevier, 229-241, 1989.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ: Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771, 1997

Pierre JM, Abderrahim L, Debiais F, Lemonnier I: *Skeletal Growth Factors*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia : 179-196, 2000

Puhl W: Optan-Warum ein neues Schaftsystems? Oral presentation: Optan-Kick-Off meeting, Ulm, Germany, 13 septembre 1999

Quinn JM, Horwood NJ, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ: Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF-kappa B ligand and support osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 15:1459-1466, 2000

Radin EL: Osteoarthritis. What is known about prevention. *Clin Orthop* 60-65, 1987

Roebuck KA, Vermes C, Carpenter LR, Fritz EA, Narayanan R, Glant TT: Down-regulation of procollagen alpha1[I] messenger RNA by titanium particles correlates with nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation and increased rel A and NF-kappaB1 binding to the collagen promoter. *J Bone Miner Res* 16:501-510, 2001

Schmalzried TP, Callaghan JJ: Wear in total hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Am* 81:115-136, 1999

Schwarz EM, Lu AP, Goater JJ, Benz EB, Kollias G, Rosier RN, Puzas JE, O'Keefe RJ: Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 18:472-480, 2000

Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT: Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro. *J Orthop Res* 13:792-801, 1995

Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT: Cellular mediators secreted by interfacial membranes obtained at revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 10:498-506, 1995

Shanbhag AS, Hasselman CT, Rubash HE: The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *Clin Orthop* 33-43, 1997

Shida J, Trindade MC, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL: Induction of interleukin-6 release in human osteoblast-like cells exposed to titanium particles in vitro. *Calcif Tissue Int* 67:151-155, 2000

Sipe JD, Bartle LM, Loose LD: Modification of proinflammatory cytokine production by the antirheumatic agents tenidap and naproxen. A possible correlate with clinical acute phase response. *J Immunol* 148:480-484, 1992

Stephensen SL, Sperling KP, Gebuhr PH: [Total hip alloplasty using the Muller method. A six and a half year follow-up study]. *Ugeskr Laeger* 157:6425-6427, 1995

Surin VV, Sundholm K: Survival of patients and prostheses after total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 148-153, 1983

Takei H, Pioletti DP, Kwon SY, Sung KL: Combined effect of titanium particles and TNF-alpha on the production of IL-6 by osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res* 52:382-387, 2000

Todd PA, Sorkin EM: Diclofenac sodium: A reappraisal of its pharmacodynamics and pharmacokinetics properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 35: 244-285, 1998

Tortora GJ, Anagnostakos NP: Principes d'anatomie et de physiologie. CEC, Montréal 1988.

Trindade MC, Lind M, Nakashima Y, Sun D, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL: Interleukin-10 inhibits polymethylmethacrylate particle induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha release by human monocyte/macrophages in vitro. *Biomaterials* 22:2067-2073, 2001

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T: Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7260-7264, 1990

Urban RM, Jacobs JJ, Gilbert JL, Galante JO: Migration of corrosion products from modular hip prostheses. Particle microanalysis and histopathological findings. *J Bone Joint Surg Am* 76:1345-1359, 1994

Vermes C, Roebuck KA, Chandrasekaran R, Dobai JG, Jacobs JJ, Glant TT: Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor kappaB, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 15:1756-1765, 2000

Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KA, Glant TT: The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg Am* 83-A:201-211, 2001

White SH: The fate of cemented total hip arthroplasty in young patients. *Clin Orthop* 29-34, 1988

