

2m11.3171-4

Université de Montréal

**Effet de l'ET-1 sur le système MMP/TIMP  
dans les chondrocytes arthrosiques**

Par

**Marjolaine Roy-Beaudry**

Département de sciences biomédicales  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maitre ès Science (M.Sc.)  
en sciences biomédicales

décembre 2003

© Marjolaine Roy-Beaudry, 2003



W

4

U58

2004

v. 067

**Direction des bibliothèques**

**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 :

**Effet de l'ET-1 sur le système MMP/TIMP  
dans les chondrocytes arthrosiques**

présenté par :

**Marjolaine Roy-Beaudry**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Denis DeBlois

Dr. Florina Moldovan

Dr. Muhammad Zafarullah

## RÉSUMÉ

Lors de nos recherches, nous avons exploré le rôle de l'endothéline-1 (ET-1) dans la dégradation du cartilage arthrosique. L'activation de la cascade métalloprotéasique lors de l'arthrose (OA) joue un rôle crucial dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et elle est contrôlée par de nombreux médiateurs synthétisés localement par les tissus articulaires. Dans ce travail, nous avons exploré l'impact de l'ET-1 sur la régulation des métalloprotéases (MMP) et les principales voies de signalisation impliquées.

Premièrement, nous avons démontré la synthèse et l'expression de l'ET-1 dans la membrane synoviale et le cartilage. Par la suite, nous démontrons que l'ET-1 augmente la production des MMP-1, MMP-3 et MMP-13 et qu'elle diminue celle de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases 1 (TIMP-1). De plus, l'ET-1 augmente la quantité de fragments du collagène de type II ainsi que la production de l'oxyde nitrique (NO). Les principales voies de signalisation empruntées par l'ET-1 sont la voie de la kinase p38, NF- $\kappa$ B, ERK  $\frac{1}{2}$  et PKA ainsi que le facteur de transcription ETS-1. Finalement, nous montrons que le pré-traitement des chondrocytes avec le phosphoramidon (inhibiteur de l'activité de l'enzyme de conversion de l'ET-1 (ECE) responsable du clivage de la Big ET-1 en ET-1 [1-21]) ne module pas l'effet de la Big ET-1, suggérant ainsi que l'action serait due à la formation d'une forme alternative d'ET-1, la ET-1 [1-32].

L'ET-1, en agissant sur la régulation des MMP et des TIMP, contribue à l'activation de la cascade des enzymes protéolytiques qui interviennent dans la destruction de la MEC et ses actions pourraient avoir un impact sur diverses pathologies dans lesquelles l'altération de la MEC est causée par l'excès des MMP telles les maladies articulaires dégénératives et inflammatoires.

**Mots clés :** ET-1, métalloprotéases, arthrose, dégradation du cartilage.

## SUMMARY

In the present research, we have explored the action of endothelin-1 (ET-1) in cartilage degradation during osteoarthritis (OA). Activation of the metalloproteinase cascade plays a major role in the degradation of the extracellular matrix (ECM) and this cascade is controlled by many factors that are synthesized by joint tissues. In this work, we have studied the impact of ET-1 on metalloproteases (MMP) regulation and explored the signalling pathways involved.

First, we have demonstrated the synthesis and expression of ET-1 in synovial membrane as well as in the cartilage. We demonstrated that ET-1 increases the production of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 and decreases that of tissue inhibitors of metalloprotease 1 (TIMP-1). Furthermore, ET-1 increases the amount of collagen type II metabolites and the production of nitric oxide (NO). We show here that p38, NF- $\kappa$ B, ERK  $\frac{1}{2}$ , PKA signalling pathways and transcription factor ETS-1 are involved in the action of ET-1. Pre-treatment of chondrocytes with phosphoramidon, an inhibitor of endothelin-converting enzyme (ECE) activity, which cleaves big ET-1 into ET-1(1-21), does not modulate the effect of big ET-1, suggesting that the observed actions are due to the production a new form of ET-1 [1-32].

By acting on the regulation of MMP and TIMP, ET-1 contributes to the activation of proteolytic enzymes. It could thus be involved in diseases where ECM destruction is caused by an excess of MMP, for example, degenerative and inflammatory joint diseases.

**Key words** : ET-1, metalloproteases, osteoarthritis, cartilage degradation.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Summary.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xiii
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE II : RECENSION DE LA LITTÉRATURE</b> .....	4
1. Physiopathologie de l'arthrose.....	5
2. Cartilage.....	7
3. Mécanismes de dégradation du cartilage.....	8
3.1. Métalloprotéases.....	11
3.1.1. <i>MMP dans le cartilage</i> .....	14
3.1.2. <i>Régulation des MMP</i> .....	16
3.1.3. <i>Régulation transcriptionnelle</i> .....	16
3.1.4. <i>Régulation post-transcriptionnelle</i> .....	17
3.2. Inhibition des MMP.....	18
3.3. Aggrécánases.....	20
3.4. Cytokines dans le cartilage.....	21
3.5. NO dans le cartilage.....	22
4. Endothéline.....	22
4.1. Isoformes.....	23
4.2. Structure.....	23
4.3. Synthèse.....	24
4.3.1. <i>De la prépro-ET-1 à l'ET-1</i> .....	24
4.3.2. <i>Conversion de la Big ET-1 par l'ECE</i> .....	26
4.3.3. <i>Conversion de la Big ET-1 par d'autres enzymes</i> .....	27
4.4. Localisation cellulaire et tissulaire des isoformes de l'ET.....	28
4.5. Récepteurs de l'ET.....	28
4.5.1. <i>Isoformes</i> .....	28
4.5.2. <i>Structure</i> .....	29
4.5.3. <i>Localisation</i> .....	29
4.6. Mécanismes d'action.....	30
4.6.1. <i>Phospholipase C et mobilisation du calcium</i> .....	30
4.6.2. <i>Protéine kinase C</i> .....	32
4.6.3. <i>Phospholipase A2</i> .....	32
4.6.4. <i>Phospholipase D et tyrosines kinases</i> .....	32
4.6.5. <i>Voie de l'AMPc</i> .....	33
4.6.6. <i>Monoxyde d'azote (NO) et GMPc</i> .....	33
5. Implication de l'ET-1 dans les tissus articulaires.....	33
6. Voies de signalisation intracellulaires.....	35
6.1. Mécanismes de régulation des MMPs par les cytokines pro-inflammatoires (voies de signalisation impliquées).....	35
6.2. ET-1 et voies de signalisation.....	39

6.3. ET-1 et MMP – voies de signalisation .....	41
7. Hypothèse et objectifs.....	41
<b>CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE .....</b>	<b>43</b>
1. Sélection de tissus .....	44
2. Culture cellulaire .....	44
3. ARN .....	45
3.1. Extraction d'ARN .....	45
3.2. RT-PCR.....	45
3.3. Northern Blotting .....	46
4. Immunohistochimie .....	47
5. Détermination des fragments de collagène de type II .....	48
6. ELISA.....	49
6.1. Étude des voies de signalisation activées par l'ET-1.....	50
7. Activité des métalloprotéases .....	51
7.1. Détermination de l'activité des collagénases.....	51
7.2. Détermination de l'activité de la MMP-3 .....	51
8. Dosage d'oxyde nitrique (NO).....	52
9. Analyse par Western blot.....	53
10. Apoptose .....	55
11. Analyse statistique .....	56
<b>CHAPITRE IV : MANUSCRIT I.....</b>	<b>57</b>
<b>CHAPITRE V: MANUCRIT II .....</b>	<b>91</b>
<b>CHAPITRE VI: MANUCRIT III .....</b>	<b>123</b>
<b>CHAPITRE VII : DISCUSSION .....</b>	<b>154</b>
<b>CHAPITRE VIII : CONCLUSION .....</b>	<b>166</b>
<b>CHAPITRE IX : BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>168</b>





## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – La description des MMP, leur poids et leurs substrats .....	13
Tableau 2 – L'activation des MMP par les MMP .....	18
Tableau 3 – Inhibiteurs utilisés pour ELISA .....	50
Tableau 4 – Inhibiteurs utilisés lors de stimulation pour dosage NO.....	52
Tableau 5 – Inhibiteurs utilisés pour analyse par Western blot .....	53
Tableau 6 – Anticorps primaires utilisés pour analyse par Western blot.....	54
Tableau 7 – Anticorps secondaires utilisés pour analyse par Western blot .....	55

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I : INTRODUCTION

### CHAPITRE II : REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1a. Mécanismes de clivage du collagène et des aggrécanes .....	9
Figure 1b. Formation de néoépitopes de collagène de type II.....	9
Figure 2. Facteurs impliqués lors de l'arthrose.....	15
Figure 3. Synthèse de l'ET-1 .....	25
Figure 4. Mécanismes d'action de l'ET-1 .....	31
Figure 5. Cascade de signalisation des MAPK .....	36
Figure 6. Promoteurs des MMP .....	38

### CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE

### CHAPITRE IV: MANUSCRIT I

#### « Endothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via MMP-1 and MMP-13 induction »

Figure 1. Immunohistochemical detection of ET-1 and the expression of the specific mRNA in human cartilage from normal and OA subjects ....	73
Figure 2. Immunohistochemical detection of ET-1 in human normal (n=8) and OA synovial membrane (n=8).....	75
Figure 3. Effect of ET-1 on collagenase-generated neo-epitopes of type II collagen. ....	77
Figure 4. Representative Northern blot of MMP-1, MMP-13 and GAPDH mRNA of human OA chondrocytes in primary culture .....	79
Figure 5.a: Dose response of ET-1 induced MMP-1 and MMP-13 in OA chondrocytes.....	81
Figure 5.b: Collagenase activity detected in conditioned media of OA chondrocytes cultured for 24 hours without ET-1 (control) or with ET-1 (10 nM)....	81
Figure 5.c: Effect of ET-1 on TIMP-1 production.....	81

### CHAPITRE V: MANUSCRIT II

#### « Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and up-regulates collagenase production »

Figure 1. Effect of protein kinase inhibitors and LY83583 on ET-1-induced MMP-13 and MMP-1 production by human OA chondrocytes .....	107
Figure 2. Effect of ET-1 on NO release from human OA chondrocytes.....	109
Figure 3. Activation of p38 MAP kinase, Akt, p42/44 and SAP/JNK by ET-1 in human OA chondrocytes.....	111
Figure 4. Effect of ET-1 on chondrocyte apoptosis and cell death .....	113

**CHAPITRE VI : MANUSCRIT III****« Stromelysin-1 (MMP-3) regulation by Big ET-1 (1-38) in human OA chondrocytes »**


- Figure 1. Effect of Big ET-1 and ET-1 on MMP-3 mRNA and MMP-3 activity. 137
- Figure 2. Dose-dependent stimulation of MMP-3 production by Big ET-1 in human OA chondrocytes. .... 135
- Figure 3. Effects of different inhibitors on the Big ET-1-induced MMP-3 production. .... 141
- Figure 4. Big ET-1 signalling pathways. .... 143
- Figure 5. NO production and iNOS protein detection in OA chondrocytes. .... 145

**CHAPITRE VII : DISCUSSION**


- Figure 7. Hypothèse des voies de signalisation impliquant l'IL-1 $\beta$  et l'ET-1 .... 165

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa :	acides aminés
ADAM-TS4 :	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin-4 motif
ADAM-TS5 :	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin-5 motif
ADN :	acide désoxyribonucléique
AP :	acide phosphorique
AP-1 :	activator protein-1
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATF-2 :	activating transcription factor-2
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
APMA :	4-aminophenylmercuric acétate
bp :	paires de bases
Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub> :	calcium intracellulaire
CATCH-22:	Cardiac defect, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate and Hypoparathyroidism resulting from 22q11.2 deletions
CDP :	chemiluminescence methods for detection of probes
Cox-2 :	cyclooxygénase-2
DAB :	3,3'-diaminobenzidine




DAG :	diacylglycérol
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EBS :	séquence de liaison ETS
ECE :	enzyme de conversion de l'endothéline
EDTA :	disodium ethylenediaminetetra-acetate dihydrate
ELISA :	enzyme linked immunosorbant assay
ERK $\frac{1}{2}$ :	extracellular signal-regulated kinase
ET-1 :	endothéline-1
ET <sub>A</sub> :	récepteur de type A de l'endothéline-1
ET <sub>B</sub> :	récepteur de type B de l'endothéline-1
FITC :	Fluorescein Isothiocyanate
GMPc :	Guanosine 3', 5'- cyclic monosphosphate
IL-17 :	interleukine-17
IL-1 $\beta$ :	interleukine-1beta
IL-6 :	interleukine-6
iNOS :	synthétase d'oxyde nitrique inductible
IP <sub>3</sub> :	inositol 1,4, 5-triphosphate
Kb :	kilobases
LIF :	leukemia inhibitor factor
L-NIL :	<i>N</i> -iminoethyl-L-lysine




MAP :	mitogen activated protein
MAPK :	MAP kinase
MAPKK :	MAP kinase kinase
MAPKKK :	MAP kinase kinase kinase
MEK :	mitogen-activated protein kinase kinase
MMP :	métalloprotéases de la matrice
MOPS :	acide 4-Morpholinepropanesulfonique
MT1-MMP :	MMP de type membranaire
NF- $\kappa$ B :	facteur nucléaire de type kappa B
NO :	oxyde nitrique
OA :	arthrose (osteoarthritis)
OSE-2 :	osteoblast specific element-2
PA :	activateur plasminogène
PBS :	solution tampon saline de phosphate
PC7 :	proprotéine convertase PC7
PCR :	reaction en chaîne avec la polymérase
PEA-3 :	Polyoma enhancer A binding protein-3
PGI <sub>2</sub> :	prostacycline
PGE <sub>2</sub> :	prostaglandine E <sub>2</sub>
PGH-2 :	prostaglandine H <sub>2</sub>

PGHS-2 :	prostaglandine H synthétase de type 2
pH i :	pH intracellulaire
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PLC :	phospholipase C
PLD :	phospholipase D
POD :	peroxidase conjuguée
PTK :	protéines tyrosines kinases
RARE :	retinoic acid responsive element
RE :	réticulum endoplasmique
ROC :	canaux indépendants du voltage
RT-PCR :	reverse transcriptase
SAPK/JNK :	stress-activated protein kinase/ c-jun N-terminal kinase
SDS :	dodecyl sulfalte de sodium
SDS-PAGE :	SDS-electrophorèse sur gel de polyacrylamide
Sil :	silencer sequence
SPRE :	stromelysin-1 PDGF responsive element
TACE :	tumor necrosis factor alpha converting enzyme
TRE :	octamer binding protein
TIMP :	inhibiteur tissulaire des MMP



TNF- $\alpha$ :	tumor necrosis factor alpha
TUNEL :	Labeling DNA Breaks Using Terminal Transferase
uPA :	activateur plasminogène de type urokinase
UV :	ultra-violet
VOC :	canaux dépendants du voltage







## REMERCIEMENTS


*Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, Dr Florina Moldovan, pour sa disponibilité et son support tout au long de la réalisation de ce projet d'étude.*

*J'aimerais exprimer ma gratitude envers tous mes collègues de laboratoire qui ont su m'apporter leur aide et leurs encouragements, merci à Fazool Shipkolye pour ses connaissances techniques et François Mineau pour réponses à mes nombreuses questions.*

*Avec une pensée plus particulière pour Mélanie Guèvremont et Mélanie Felx pour leur aide, leurs conseils, autant scientifiques que personnels, mais surtout pour leur amitié.*

*Je tiens également à remercier de tout cœur mes parents, Johanne et Philippe, ainsi que ma sœur Véronique, pour leur soutien et leurs encouragements si précieux qui m'ont permis de mener à terme ce projet de maîtrise.*

*Je remercie chaleureusement Martin, pour son soutien moral, ses encouragements et ses conseils judicieux.*



*À toutes les personnes qui m'ont  
aidée de près ou de loin ...*

*Mes parents, Johanne et Philippe,  
ma sœur, Véronique,  
mon complice, Martin*

# **CHAPITRE I : INTRODUCTION**

L'arthrose est une maladie irréversible et destructible qui affecte les différents tissus de l'articulation. L'étiologie de cette maladie est encore mal définie. Cette arthropathie touche principalement les personnes âgées et est la principale cause d'invalidité pour cette catégorie de population (Martel-Pelletier et al, 2000). L'arthrose est le reflet d'une déstabilisation entre la synthèse et la dégradation des macromolécules des tissus de l'articulation. Les recherches actuelles sur l'arthrose ont pour but l'identification de nouveaux facteurs susceptibles d'être impliqués dans le développement et/ou la progression des lésions du cartilage, afin de proposer de nouveaux champs thérapeutiques axés sur les causes et non seulement sur les conséquences de cette maladie.

Lors de l'altération du cartilage, une augmentation marquée de facteurs cataboliques et une diminution des facteurs anaboliques sont notées. Ce déséquilibre cause une érosion du cartilage qui libère des produits de dégradation dans le liquide synovial déclenchant une réaction inflammatoire et induisant davantage la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines activent les chondrocytes provoquant une surproduction d'enzymes protéolytiques. Parmi les différentes enzymes, il y a les métalloprotéases (MMP) qui possèdent de nombreuses fonctions dans l'altération du cartilage. Récemment, il a été démontré que l'endothéline-1 (ET-1), un peptide de 21 acides aminés connu pour son action vasoconstricteur, est capable d'agir sur le métabolisme des chondrocytes (Khatib, *et al*, 1997).

Il a été démontré que l'ET-1 est synthétisée par les chondrocytes articulaire du rat (Khatib *et al*, 1997). De plus, ces cellules possèdent les deux récepteurs spécifiques à l'ET-1 (ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>) (Khatib *et al*, 1998). Synthétisée localement par les chondrocytes, l'ET-1 serait, entre autres, impliquée dans le contrôle de la prolifération des chondrocytes, plus précisément dans le contrôle de la formation de clones cellulaires (amas de deux ou plusieurs chondrocytes) situé au niveau des couches supérieures du cartilage site anatomique dans lequel les changements structuraux du cartilage débutent. Ces clones chondrocytaires sont

constitués des cellules métaboliquement très actives qui synthétisent des enzymes protéolytiques et des cytokines pro-inflammatoires en quantité élevée. Elles produiraient aussi des protéoglycanes dont la qualité moléculaire est appauvrie. Des résultats récemment publiés (Messai *et al*, 2000) montrent aussi que le vieillissement des chondrocytes serait associé à une surproduction d'ET-1. Ces chondrocytes vieillissants présentent une plus grande sensibilité à ce facteur en comparaison avec les cellules jeunes. Cette observation est importante, car l'arthrose atteint de façon prépondérante les personnes âgées. Basé sur ces données de la littérature, nous avons développé notre hypothèse de travail selon laquelle l'ET-1 pourrait avoir un rôle catabolique dans l'arthrose humaine.

L'implication de l'ET-1 dans la dégradation du cartilage est devenue intéressante à étudier puisque dans la littérature, certains inhibiteurs des récepteurs de l'ET-1 disponibles commercialement, se sont avérés bénéfiques quant à la réduction de la douleur provoquée par injections des agents inflammatoires dans l'articulation animale. Cette étude vise à établir les effets cataboliques de l'ET-1 dans le cartilage arthrosique humain ainsi que les interactions possibles entre l'ET-1 et le système MMP/TIMP. Grâce aux données obtenues, il est possible d'envisager l'utilisation des inhibiteurs des récepteurs de l'ET-1 *in vivo* dans des modèles d'arthrose expérimentale. À long terme, ce travail pourrait ouvrir de nouvelles approches thérapeutiques.

## **CHAPITRE II : RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

## 1. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ARTHROSE

L'arthrose constitue une des maladies chroniques les plus fréquentes, atteignant environ 15 % de la population mondiale, dont trois millions de Canadiens (un sur 10). Au Canada, le coût de cette maladie est estimé à plus de 5 milliards de dollars par année (Santé Canada, 2003).

C'est une maladie idiopathique et multifactorielle. Plusieurs facteurs incluant l'âge, le sexe, les prédispositions génétiques, le stress mécanique, les traumatismes articulaires, l'obésité, les prédispositions biochimiques et métaboliques interviennent directement dans le développement et la progression de cette maladie. Les premiers changements pathologiques dans l'arthrose incluent la dégradation et la perte du cartilage et l'hypertrophie de l'os sous-chondral. Dans les phases plus avancées, l'inflammation de la membrane synoviale est observée. Cette maladie a longtemps été attribuée aux conséquences naturelles du vieillissement et à l'abrasion passive du cartilage, mais il est maintenant clair que des changements métaboliques sont responsables des altérations structurelles observées au niveau du cartilage, de l'os et la membrane synoviale (Martel-Pelletier *et al*, 2003).

Dans une articulation saine, il y a un équilibre entre les mécanismes de dégradation et de synthèse de la matrice cartilagineuse. Ces mécanismes sont contrôlés presque exclusivement par les chondrocytes qui répondent aux cytokines, aux facteurs de croissance et aux stimuli physiques. Ces réponses créent un déséquilibre entre la vitesse de synthèse et la vitesse de dégradation enzymatique de la matrice cartilagineuse. Les processus de réparation deviennent alors insuffisants pour subvenir à l'intégrité d'une matrice normale et les mécanismes cataboliques prennent le dessus sur les mécanismes anaboliques (Martel-Pelletier *et al*, 2000).

Durant l'arthrose, il n'y a pas seulement des changements au niveau du cartilage, mais aussi au niveau de l'os sous-chondral. Il a été suggéré que la formation d'ostéophytes serait un processus pour compenser la dégradation du cartilage et pour redistribuer les forces mécaniques à travers l'articulation. Mais il est encore incertain si la sclérose osseuse initie ou si elle est seulement impliquée dans la perte progressive du cartilage (Radin *et al*, 1986). Même si le rôle des ostéophytes est encore en débat, il a été suggéré que l'épaississement sclérotique de l'os sous-chondral possède un rôle relié à la progression de l'arthrose. Le changement dans la densité et dans l'architecture du plateau tibial forme des micro-fractures dans l'os sous-chondral ainsi que dans le cartilage (Radin *et al*, 1982). Au niveau biochimique, les mécanismes exacts de l'épaississement du plateau tibial ne sont pas complètement connus. D'après la littérature des facteurs locaux produits par les ostéoblastes ont un rôle important dans la dégradation du cartilage et l'altération de l'os sous-chondral (Bobinac *et al*, 2003). Ces facteurs produits par les ostéoblastes provoqueraient la sclérose de l'os avant même la dégradation et la perte de cartilage (Creamer *et al*, 1997 ; Lajeunesse D, 2004).

La membrane synoviale semble être impliquée dans les phases plus avancées de l'arthrose. La membrane synoviale arthrosique est caractérisée par une hyperplasie des cellules synoviales de la couche bordante, un œdème interstitiel, une augmentation de la vascularisation et une infiltration cellulaire (Saito *et al*, 2002). Dans la membrane synoviale arthrosique, les cellules de la couche bordante jouent un rôle majeur en produisant des facteurs inflammatoires tels IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, LIF et IL-17 (Kirkham *et al*, 1989). L'inflammation de la membrane synoviale est secondaire à la dégradation du cartilage et à la sclérose osseuse. La dégradation du cartilage produit des fragments de protéoglycanes et de collagènes qui se retrouvent dans le liquide synovial. Certains fragments sont incorporés dans la membrane synoviale (Haynes *et al*, 2002) par les macrophages synoviaux ou sont excrétés dans le sang (Thonar *et al*, 1993). Les produits de dégradation libérés stimulent les médiateurs pro-inflammatoires. L'inflammation de la membrane synoviale est induite par un mécanisme immunologique dû à



l'interaction entre les macrophages synoviaux et les lymphocytes T auxiliaires (Saito *et al*, 2002).

## 2. CARTILAGE

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif constitué d'un seul type de cellules, les chondrocytes, qui sont entourées d'une matrice extracellulaire abondante. La structure du cartilage est bien adaptée à ses deux fonctions : transmission des charges et glissement des surfaces articulaires. Le cartilage est composé de 80% d'eau et de 20% de protéoglycanes et de collagène. (Mitrovic *et al*, 2000).

Les protéoglycanes sont une classe de macromolécules composites, de poids moléculaire élevé, faites d'une protéine axiale et d'un grand nombre (150 en moyenne) de chaînes linéaires de glycosaminoglycanes (Hascall, 1988). Les glycosaminoglycanes sont constitués d'une chaîne de polysaccharides composée principalement de sulfate de chondroïtine et de sulfate de kératane. La combinaison des glycosaminoglycanes et de la structure linéaire de protéines constitue le monomère protéoglycane. Les chaînes de glycosaminoglycanes sur chaque monomère génèrent une pression osmotique importante qui permet au cartilage de résister aux forces de compression. Dans le tissu, ces molécules existent sous formes isolées (protéoglycane monomère) et accolées le long d'un filament d'acide hyaluronique à côté des protéines de liaison dans une structure moléculaire énorme, pouvant atteindre plusieurs centaines de millions de Daltons et quelques microns de longueur (agrégat de protéoglycanes). Ces agrégats, nommés agréganes, maintiennent un niveau d'hydratation adéquat dans le cartilage articulaire, à l'aide de leurs chaînes de sulfate de chondroïtine.

Le collagène représente 50% à 60% du poids sec du cartilage. Il existe essentiellement sous forme de fibres et fibrilles dont la densité, l'épaisseur et l'orientation varient en fonction des différentes zones histologiques (zone

superficielle, intermédiaire et profonde). Le collagène de type II est la forme de collagène majoritairement présente dans le cartilage. C'est un collagène fibrillaire, homotrimérique, constitué de trois chaînes  $\alpha$ -polypeptidiques identiques. Chaque chaîne est enroulée autour de son axe longitudinal à pas de vis gauche et, entre elles, en une triple hélice, à l'image des filaments d'une corde. À côté du collagène de type II, il existe dans le cartilage articulaire les collagènes, dits mineurs, qui représentent au maximum 5 à 10% du collagène total. Ce sont les collagènes de types VI, IX, X et XI (Mitrovic *et al*, 2000).

### 3. MÉCANISMES DE DÉGRADATION DU CARTILAGE

Lors de l'arthrose, les changements biochimiques affectent les deux principales composantes du cartilage, les agrégats de protéoglycanes et le collagène.

Les protéases initient la dégradation du cartilage en agissant selon un schéma bien défini dans le temps. Les études sur la protéolyse du collagène et des protéoglycanes, *in vitro* et *in vivo*, démontrent que les agrécans sont clivés rapidement après l'induction des cytokines pro-inflammatoires. Ce processus implique les agrécanasés et par la suite les MMP. Le clivage du collagène de type II est observé aux mêmes sites que les clivages des agrécans par les agrécanasés. Par l'utilisation d'explants de cartilage, il a été démontré que le clivage du collagène de type II est secondaire aux clivages des agrécans. La figure 1a démontre clairement les étapes de dégradation de la matrice. L'induction de la dégradation du cartilage par l'IL-1 dans les explants, résulte en un clivage

Figure 1a. Mécanisme de clivage du collagène et des agrécanes

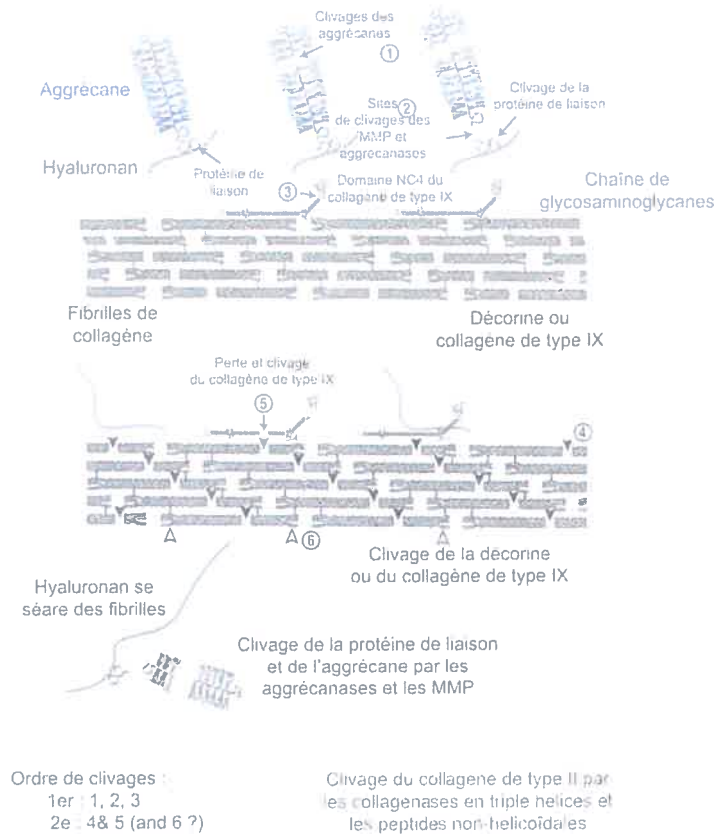
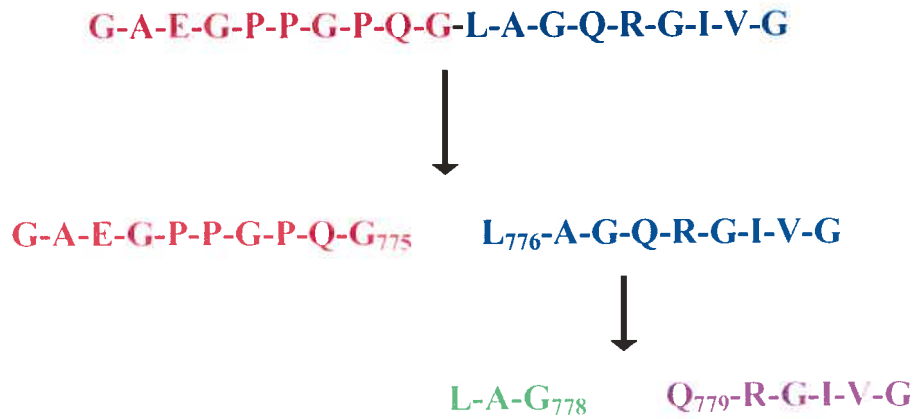


Figure 1b. Formation de néoépitopes de collagène de type II



des aggrécans par les aggrécanses accompagné d'un clivage du domaine NC4 (non-collagèneux) de la chaîne  $\alpha 1$  (IX). Cette action est suivie par une perte du domaine COL2 (collagèneux) de la chaîne  $\alpha 1$  (IX) qui permet aux collagénases de cliver le collagène de type II. La perte de collagène s'effectue par une augmentation de la dénaturation des trois chaînes  $\alpha$ -polypeptidiques du collagène de type II (Silver *et al*, 2001). Cette dégradation est effectuée par les collagénases, une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes comprenant la MMP-1 (collagénase-1), la MMP-8 (collagénase-2) et la MMP-13 (collagénase-3). Cependant, les MMP-1 et MMP-13 clivent davantage le collagène de type II, tandis que la MMP-8 aurait un effet moindre, car celle-ci n'est présente qu'en très petite quantité dans le cartilage articulaire humain (Stremme *et al*, 2003). Ces trois collagénases clivent les collagènes de type I, II et III au site Gly<sup>775</sup>-Leu/Ile<sup>776</sup> se situant dans chacune des trois chaînes  $\alpha$ -polypeptidiques. Ce clivage génère deux fragments de collagène qui spontanément se dénature en gélatine non-hélicoïdal (Figure 1b). Ces gélatines peuvent être clivées par d'autres métalloprotéases tels que la stromélysine-1 (MMP-3) et les gélatinases (MMP-2 et MMP-9). Un des fragments générés par les collagénases subit un autre clivage au site Gly<sup>778</sup>-Gln<sup>779</sup>, clivage toujours effectué par les collagénases (Billinghurst *et al*, 1997). Ces clivages génèrent donc des fragments de collagène de type II, nommés néoépitoques, qui se retrouvent dans le liquide synovial des patients arthrosiques (Christgau *et al*, 2001). Ces néoépitoques se retrouvent également dans le sérum et dans l'urine et peuvent être utilisés comme marqueurs dans le catabolisme du cartilage (Christgau *et al*, 2001).

La diminution de protéoglycanes et les dommages causés à la structure du collagène conduisent à la perte des propriétés biomécaniques du cartilage qui sont physiologiquement assurées par une matrice normale. De plus, dès qu'il y a perte d'aggrécans, le collagène de type II est considérablement endommagé. Lorsque les fibrilles de collagènes sont rompues, il est impossible de retenir les aggrécans et ceci cause des dommages irréparables et permanents au cartilage articulaire (Silver *et al*, 2001).

En général, la matrice extracellulaire est dégradée par quatre principales familles d'enzymes : les cystéines protéases, les aspartates protéases, les sérines protéases et les métalloprotéases (Barrett AJ, 1994). Il y a deux voies protéolytiques principales : la voie intracellulaire où les protéines sont hydrolysées par les cystéines et les protéases aspartates à un pH acide, et la voie extracellulaire où les protéines sont digérées par les protéases sérines et les métalloprotéases à un pH neutre.

### 3.1. Métalloprotéases

Les métalloprotéases (MMP) sont une famille d'enzymes zinc-dépendantes synthétisées en tant que formes latentes (inactives), et activées par clivage. Les MMPs actives sont capables de dégrader une multitude de protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène, les protéoglycanes, la fibronectine et la laminine (Woessner JF, 1991). À ce jour, au moins 25 différentes MMP sont connues (Tableau 1). Basés sur leurs structures et leurs fonctions, la famille des MMP est divisée en cinq principaux groupes :

- (i) les collagénases (MMP-1,-8,-13)
- (ii) les gélatinases (MMP-2,-9)
- (iii) les stromélysines (MMP-3,-10,-11)
- (iv) un groupe hétérogène qui inclut la matrilysine (MMP-7), l'énamélysine (MMP-20), la macrophage metalloélastase (MMP-12) et la MMP-19
- (v) les MMP de types membranaires (MMP-14,-17,-24,-25).

D'autres MMP ont été identifiés, mais leurs fonctions n'ont pas encore été définies (Nagase H, 1997). Même si les MMP ne proviennent pas du même gène, elles partagent des propriétés structurales et fonctionnelles, incluant une activité optimale à pH neutre et la nécessité du calcium et du zinc pour leur activité biologique. En générale, les MMP sont composés de trois domaines distincts : un

domaine amino-terminal, correspondant au propeptide qui maintient la phase d'inactivité, un domaine catalytique (qui se lie au calcium et au zinc) et un domaine haemopexin situé en région C-terminale (Nagase H, 1997).

Tableau 1 – La description des MMP, leur poids et leurs substrats

MMP	Nom enzymatique	Latente/active (kDa)	Substrats préférentiels
MMP-1	Collagénase-1	52/43	Collagène type I, II, III, VII, X, gélatines, aggrecane, tenascine, protéines de liaison
MMP-2	Gélatinase A	72/62	Gélatines, collagènes type I, II, III, I', V, VII, X, XI, fibronectine, laminine, aggrecane, élastine, tenascine, vitronectine
MMP-3	Stromélysine-1	52/43	Aggrecane, gélatine, fibronectine, laminine, protéines de liaison, élastine, collagène type I, III IV, V, VIII, IX, X, vitronectine, tenascine, decorin, activation procollagenase-1
MMP-4,-6	Identifiée comme MMP-3		
MMP-5	Identifiée comme MMP-2		
MMP-7	Matrilysine	28/19	Aggrecane, fibronectine, vitronectine, tenascine, laminine, gélatine, collagène type IV, élastine, activation procollagenase-1, protéines de liaison
MMP-8	Collagénase neutrophile	75/55	Collagène type I, II, III, VIII, X, aggrecane, protéines de liaison
MMP-9	Gélatinase B	92/82	Gélatines, collagène type I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV
		/65	Aggrecane, élastine, vitronectine
MMP-10	Stromélysine-2	52/44	Aggrecane, fibronectine, laminine, collagène type I, III, VI, V, VIII, IX, gélatine, élastine, laminine
MMP-11	Stromélysine-3	51/46	Fibronectine, laminine, collagène type IV, aggrecane, gélatine, $\alpha$ 1-antitrypsin, serpin
MMP-12	Metalloelastase	52/20	Elastine
MMP-13	Collagénase-3	52/42	Collagène type I, II, III, VII, X, aggrecane, gélatine
MMP-14	MT1-MMP	64/54	Activation de la Pro-MMP-2, collagène type I, II, III, dermatan sulphate, laminine, fibronectine, gélatine, vitronectine
MMP-15	MT2-MMP	71/61	
MMP-16	MT3-MMP	66/56	Activation de la Pro-MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	62/51	
MMP-18	Collagénase-4	53/42	
MMP-19	RASI-1	54/45	
MMP-20	Enamelysine	54/22	Matrice de l'émail
MMP-21	X-MMP	70/53	
MMP-22	C-MMP	52/42	
MMP-23	CA-MMP ou MIFR-1	56/65	
MMP-24	MT5-MMP	63/45/28	
MMP-25	MT6-MMP	63/58	
MMP-26	Endometase	28/19	
MMP-27	GenBank AF195192		
MMP-28	Épilysin	58/48	

### 3.1.1. MMP dans le cartilage

Les principales protéinases impliquées dans la destruction du cartilage lors de l'arthrose sont les métalloprotéases. Les MMP sont produites par les chondrocytes et sont libérées dans la matrice extracellulaire (Figure 2). On a démontré la présence des collagénases, stromélysines et gélatinases dans le cartilage. Elles ont plusieurs fonctions, mais lors de l'arthrose, elles contribuent toutes à la dégradation des différentes composantes du cartilage.

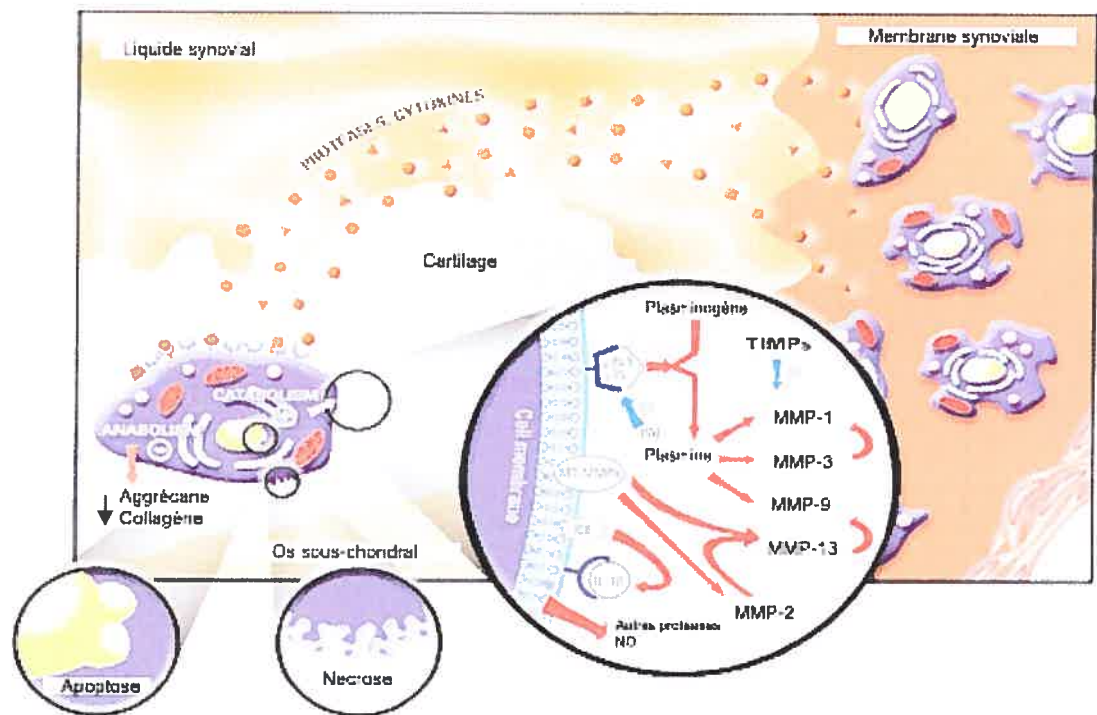
Il y a une augmentation considérable du niveau des collagénases durant l'arthrose. Une fois activée, elles peuvent cliver le collagène endogène. Dans le cartilage, chaque collagénase possède une action biochimique différente car elles clivent plus spécifiquement un type de collagène (Martel-Pelletier *et al*, 1996). La MMP-13 a une spécificité accrue pour le collagène de type II en étant 5-10 fois plus active sur ce type comparé à la MMP-1 (Reboul *et al*, 1996). La distribution de la MMP-1 et -13 est très différente dans le cartilage arthrosique, la MMP-1 étant présente dans la zone superficielle tandis que la MMP-13 se retrouve principalement dans la zone intermédiaire et profonde du cartilage (Moldovan *et al*, 1997). Les résultats démontrent que la MMP-1 est impliquée dans la destruction des tissus durant le processus d'inflammation tandis que la MMP-13 a un rôle dans la phase de remodelage de l'arthrose (Reboul *et al*, 1996).

Les gélatinases clivent préférentiellement le collagène dénaturé, la gélatine et le collagène de type IV et V et elles sont également augmentées dans le cartilage lors de l'arthrose (Martel-Pelletier *et al*, 2000).

La MMP-3 clive les protéoglycanes, la fibronectine, l'élastine et la laminine. Il a été démontré que la MMP-3 est augmentée proportionnellement au degré de dégradation des protéoglycanes. Cette protéase est un activateur naturel



Figure 2. Facteurs impliqués lors de l'arthrose



*Pelletier et al, 2002*

de la pro-MMP-1, pro-MMP-13 (Suzuki *et al*, 1990), pro-MMP-9 (Ogata *et al*, 1992) et de la pro-MMP-8 (Moilanen *et al*, 2003).

### *3.1.2. Régulation des MMP*

Les MMP sont synthétisés en pro-enzymes qui doivent être activés par un clivage protéolytique. L'activation de la forme latente résulte d'un clivage du propeptide du domaine N-terminale de l'enzyme. Les MMPs sont contrôlées à plusieurs niveaux tels la synthèse, l'activation et l'inhibition de leurs activités. Le contrôle s'effectue par des facteurs physiologiques et pathologiques : cytokines pro-inflammatoires, hormones, facteurs de croissance et protéases de façon à maintenir un équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme dans le tissu articulaire. La régulation de la synthèse des MMP s'effectue au niveau transcriptionnelle (stimulation ou inhibition de l'expression des gènes), au niveau post-transcriptionnelle incluant l'activation des MMP latentes et l'inhibition des MMP actives.

### *3.1.3. Régulation transcriptionnelle*

Les mécanismes de régulation de la transcription des MMP sont complexes. La région du promoteur des gènes ont été clonés, séquencés et analysés, et plusieurs séquences d'ADN agissant en position cis ont été identifiées. Ces éléments sont impliqués dans les activités basales et modulateurs de la transcription. Pour la majorité des MMP, l'activation transcriptionnelle dépend de la présence du site activator protein-1 (AP-1), ce site est généralement situé dans la région proximale du promoteur du gène des MMP (Benbow, 1997). D'autres sites cis-acting agiraient avec le site AP-1 afin d'obtenir une induction maximale, ces autres sites varient d'une MMP à l'autre.

#### 3.1.4. Régulation post-transcriptionnelle

Les pro-MMP secrétées peuvent être activées par un grand nombre d'activateurs naturels. En retour, les MMPs activées sont régulées par des inhibiteurs qui se lient à leur site actif et inhibent leur activité catalytique. L'activation des MMP est une étape importante dans la dégradation des tissus conjonctifs. Les MMP produits nécessitent un clivage de 10 kDa au niveau N-terminal de l'enzyme. Ce processus clive un résidu de cystéine présent dans tous les pro-domaines des MMP qui est normalement lié au site actif du zinc et qui bloque par le fait même le site qui permet à la MMP de rester dans la phase latente. L'activation de MMP en phase latente est effectuée par le remplacement d'un groupe sulfhydryl sur le résidu cystéine par de l'eau. La dissociation du lien Cys-zinc peut être effectuée *in vitro* par des réactifs sulfhydryl tels que des métaux ioniques lourds, des oxydants, des composés organo-mercuriels, ou des iodacétamides (Van Wart *et al*, 1990). Les MMP latentes peuvent aussi être activées par un changement de conformation de la chaîne polypeptidique induit par des détergents ou des agents chaotropiques (Springman *et al*, 1990).

Plusieurs MMP peuvent activer d'autres pro-MMP, suggérant l'existence d'une cascade finement contrôlée *in vivo*. La Tableau 2 résume les actions d'activation des MMP par des MMP. Ces activations se produisent à l'extérieur de la cellule pour la majorité des MMP, tandis que l'activation de la MMP-13 s'effectue à la surface de la cellule. L'activation peut se faire par d'autres familles de protéases, plus précisément le système activateur du plasminogène (PA)/plasmine et la cathepsine B. L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) est une protéase qui transforme le plasminogène en plasmine. En plus d'être augmentées dans les articulations arthrosiques, les protéases PA/plasmine possèdent un rôle important dans la destruction du cartilage. La plasmine est capable de dégrader les protéoglycanes et d'activer la pro-MMP-1, la pro-MMP-3, la pro-MMP-9 et la pro-MMP-13 (Milner *et al*, 2001). Une corrélation positive a été démontrée entre la quantité de collagénases actives et le niveau de plasmines présentes.

Tableau 2 – L'activation des MMP par les MMP

Activateurs des MMP	MMP activées
MT1-MMP	MMP-13
	MMP-2
MMP-13	MMP-9
MMP-10	MMP-8
MMP-3	MMP-1
	MMP-13
	MMP-9
	MMP-7
MMP-7	MMP-1
	MMP-9

### 3.2. Inhibition des MMP

Une fois activée, l'activité des MMP est contrôlée par le processus d'inhibition de leur activité. Cette inhibition est effectuée par deux types d'inhibiteurs naturels, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) et l' $\alpha_2$ -macroglobuline (Gomez *et al*, 1997). L' $\alpha_2$ -macroglobuline est une large protéine de 750 kDa, elle est produite dans le foie et elle est retrouvée dans le sérum et le liquide synovial chez les patients arthrosiques comme chez les personnes saines. Cette protéine agit comme inhibiteur non-spécifique des protéases en capturant les enzymes et en bloquant l'accès au substrat. Dû à son grand poids moléculaire, elle ne peut pénétrer dans le cartilage. Sa relation avec la dégradation des tissus n'est pas encore définie, mais son rôle serait joué exclusivement dans le liquide synovial ou au site inflammatoire dans la membrane synoviale.

Les TIMP sont les inhibiteurs spécifiques des MMP et ils sont synthétisés par les mêmes cellules que celles-ci. À ce jour, quatre TIMP ont été identifiées (TIMP-1 à TIMP-4) (Baker *et al*, 2002). Chaque protéine est le produit d'un gène différent, mais les protéines partagent plusieurs caractéristiques structurales : elles possèdent tous 12 résidus cystéine conservés et un domaine amino-terminal nécessaire pour inhiber les MMP. Les TIMP ont un poids moléculaire qui varie autour de 21 kDa et ils sont glycosylés. Les MMP sont inhibés par les TIMP avec un ratio stœchiométrique 1 : 1. Ils exercent leur pouvoir d'inhibition en se liant spécifiquement et de façon non-covalente au site actif des MMP. Les TIMP-1 et TIMP-2 sont présents dans le cartilage et sont synthétisés par les chondrocytes, mais seulement le TIMP-1 a été détecté dans les tissus articulaires arthrosiques et dans le liquide synovial. Le TIMP-3 a tout d'abord été trouvé associée à la matrice extracellulaire (Leco *et al*, 1994) et il a été prouvé qu'il est exprimé dans les tissus articulaires arthrosiques (Su *et al*, 1999). Le TIMP-4 a récemment été identifié et se trouve en quantité élevée dans le tissu cardiaque et en petite quantité dans certains organes comme le foie et les reins (Bigg *et al*, 1997). La TIMP-4 a été récemment identifiée dans le cartilage (Huang *et al*, 2002) mais son rôle physiologique ou pathophysiologique n'est pas clairement démontré. Les TIMP se lient avec des affinités différentes aux différentes métalloprotéases. Dans les tissus arthrosiques, un déséquilibre entre les quantités de TIMP et de MMP peut conduire à une plus grande quantité de MMP, ce qui favoriserait la dégradation du cartilage.

Ces inhibiteurs naturels des MMP sont une cible importante dans la prévention de la dégradation du cartilage lors de l'arthrose. Une équipe a d'ailleurs utilisé des vecteurs d'adénovirus pour effectuer un transfert de gènes des TIMP. Les résultats sont concluants et encourageants car une surexpression des TIMP, particulièrement le TIMP-3, a réduit l'invasion des fibroblastes de la membrane synoviale lors d'arthrite rhumatoïde (van der Laan WH *et al*, 2003).

### 3.3. Aggrécánases

Lorsqu'une analyse des fragments d'aggrécánases retrouvés dans le liquide synovial est effectuée, on y retrouve deux types de fragments : l'un causé par les MMP et l'autre par les aggrécánases.

Les ADAMTS (A disintegrin-like And Metalloprotease domain with Thrombospondin type 1 motifs) sont une sous-classe des ADAM, comparativement aux membres de la famille ADAM, ils n'ont pas le domaine transmembranaire et contiennent un ou plusieurs motifs de thrombospondin de type I leur permettant de se lier aux glycosaminoglycanes (Kaushal *et al*, 2000). Les ADAMTS présents dans le cartilage sont les ADAMTS-4 et ADAMTS-5 et ils sont respectivement nommés aggrécánase-1 et aggrécánase-2. Ces enzymes sont les principaux médiateurs de la dégradation des aggrécánases (Vankemmelbeke *et al*, 2003).

Effectivement, le site de clivage protéolytique dominant les fragments d'aggrécánases dans le liquide synovial n'est pas le même que celui préférentiellement généré par la MMP *in vitro* sur les aggrécánases. Plusieurs MMP (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -13, -14) ont la possibilité de cliver l'aggrécane à la liaison Asn<sup>341</sup>-Phe<sup>342</sup> *in vitro*, tandis que les aggrécánases clivent l'aggrécane à la liaison Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>. Les MMP-8 et MT1-MMP ont aussi la capacité de cliver au site Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup> (Arner *et al*, 1997), mais ils doivent être présents en très grande quantité, hors, dans le cartilage (tant normal qu'arthrosique) la MMP-8 est présente en faible quantité et ne peut être responsable de cette fonction (Stremme *et al*, 2003). Ces données de la littérature, suggèrent donc que, dans le cartilage arthrosique, le clivage des aggrécánases s'effectue principalement par l'aggrécánase et que le clivage par MMP n'a qu'un rôle secondaire.

### 3.4. Cytokines dans le cartilage

D'après les nombreuses études effectuées sur le rôle des MMP dans l'arthrose humaine, il est évident que l'altération enzymatique est une cause principale de la dégradation du cartilage. Un rôle important est attribué aux facteurs d'induction de la synthèse et de l'expression de ces enzymes et de la diminution de leurs inhibiteurs naturels (TIMP). Les évidences conduisent vers les cytokines pro-inflammatoires qui seraient responsables de ces processus. IL-1 $\beta$  est la cytokine charnière dans la destruction du cartilage et elle serait l'inducteur de la cascade enzymatique, tandis que le TNF- $\alpha$  dirige le processus inflammatoire. Il n'est pas clair si l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  agissent indépendamment, en concert ou de façon hiérarchique lors de l'arthrose. Ces deux cytokines augmentent la synthèse d'enzymes tels MMP et activateur plasminogène (PA), inhibent la synthèse d'inhibiteurs physiologiques incluant les TIMP, inhibent la synthèse de collagènes et de protéoglycans, stimulent la production de médiateurs inflammatoires tels l'oxide nitrique (NO) et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), inhibent la production de IL-1ra, un inhibiteur de l'effet de IL-1 $\beta$ , et seraient impliquées dans l'apoptose et la nécrose cellulaire. Ainsi, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  jouent un rôle majeur dans la dégradation du cartilage (Martel-Pelletier *et al*, 2000).

Une autre cytokine a un impact dans l'arthrose, l'IL-17. Cette cytokine est induite par les lymphocytes T et joue un rôle dans les premières étapes de l'inflammation. Dans le cartilage humain, IL-17 induit la synthèse de la forme inducible de NO, régule la production de la MMP-3 et inhibe la production de protéoglycans. En plus de ces actions cataboliques, elle peut augmenter l'effet d'autres médiateurs de l'inflammation tels que IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 et la PGE<sub>2</sub> (Benderdour *et al*, 2002).

### 3.5. NO dans le cartilage

De plus, le radical libre de l'oxide nitrique (NO) est aussi un facteur qui favorise le catabolisme du cartilage OA. Comparé au cartilage normal, le cartilage arthrosique produit une grande quantité de NO autant de façon spontané que sous des l'influence des cytokines pro-inflammatoires (Pelletier *et al*, 1998). Un haut niveau de nitrite/nitrate est retrouvé dans le liquide synovial et dans le sérum de patients arthrosiques. Ceci serait le résultat d'une induction de l'expression et de la synthèse de la synthase NO inductible (iNOS) (McInnes *et al*, 1996). Le NO inhibe la synthèse des macromolécules de la matrice du cartilage et diminue la réplication d'ADN (Gassner *et al*, 2000). De plus, il augmente l'induction de la dégradation du cartilage effectué par l'IL-1 $\beta$  et l'inhibition de la production de NO semble ralentir la progression de l'arthrose. Il a été démontré qu'*in vitro*, le NO pourrait aussi augmenter la synthèse des MMP et leur activation dans les chondrocytes et le cartilage articulaire (Murrel *et al*, 1995). *In vivo*, dans un modèle animal arthrosique, l'inhibition sélective de la iNOS (synthase NO inductible) génère un effet protecteur sur les tissus de l'articulation des animaux OA en diminuant la dégradation de la matrice extracellulaire et les MMP.

## 4. ENDOTHÉLINE

En 1988, Yanagisawa isole dans le surnageant des milieux de culture de cellules endothéliales d'aorte porcine un facteur thermolabile d'origine peptidique ayant la propriété d'induire une forte vasoconstriction (Yanagisawa, *et al*, 1988). Ce peptide constitué de 21 acides aminées fut nommé endothéline-1 (ET-1). Mise en évidence dans d'autres tissus, l'ET-1 semble impliquée dans des processus physiologiques et pathologiques variés, laissant présager des perspectives diagnostiques et thérapeutiques intéressantes. À ce jour, trois isoformes constituent la famille des endothélines : ET-1, ET-2 et ET-3 (Inoue *et al*, 1989). Les trois ET peuvent induire des effets semblables ou opposés. La diversité de leurs effets pharmacologiques serait liée à leur distribution et à la proportion de



leurs récepteurs spécifiques dans les tissus cibles. L'ET-1 est connue pour son activité de vasoconstriction, mais elle possède aussi un rôle dans la prolifération cellulaire (Takahashi *et al*, 2001), l'invasion tumorale (Rosano *et al*, 2001), l'asthme (Spiropoulos *et al*, 2003) et plusieurs autres pathologies.

#### 4.1. Isoformes

Les trois ET sont les produits de trois gènes différents (Inoue *et al*, 1989). Chez l'homme les gènes des endothélines ET-1, ET-2 et ET-3 sont localisés sur les chromosomes 6,1 et 20 (Arinami *et al*, 1991). Le gène de l'ET-1 présente cinq exons et quatre introns avec des séquences de régulation TATA et CAAT box (Inoue *et al*, 1989). Il s'étend sur 6,8 kb et code pour un transcrit primaire de 2,3 kb qui est traduit en préproendothéline-1.

#### 4.2. Structure

Les ET présentent une forte analogie de structure avec les sarafotoxines (toxines présentes dans le venin de serpent, *Atractaspis engaddensis* (Kloog et Sokolovsky, 1989). L'ET-1 diffère de l'ET-2 par 2 acides aminés et de l'ET-3 par 6 acides aminés. Chacune des trois endothélines possèdent quatre résidus cystéine formant deux ponts disulfures, entre les acides aminés en position 1-15 et 3-11 (Janes *et al*, 1994).

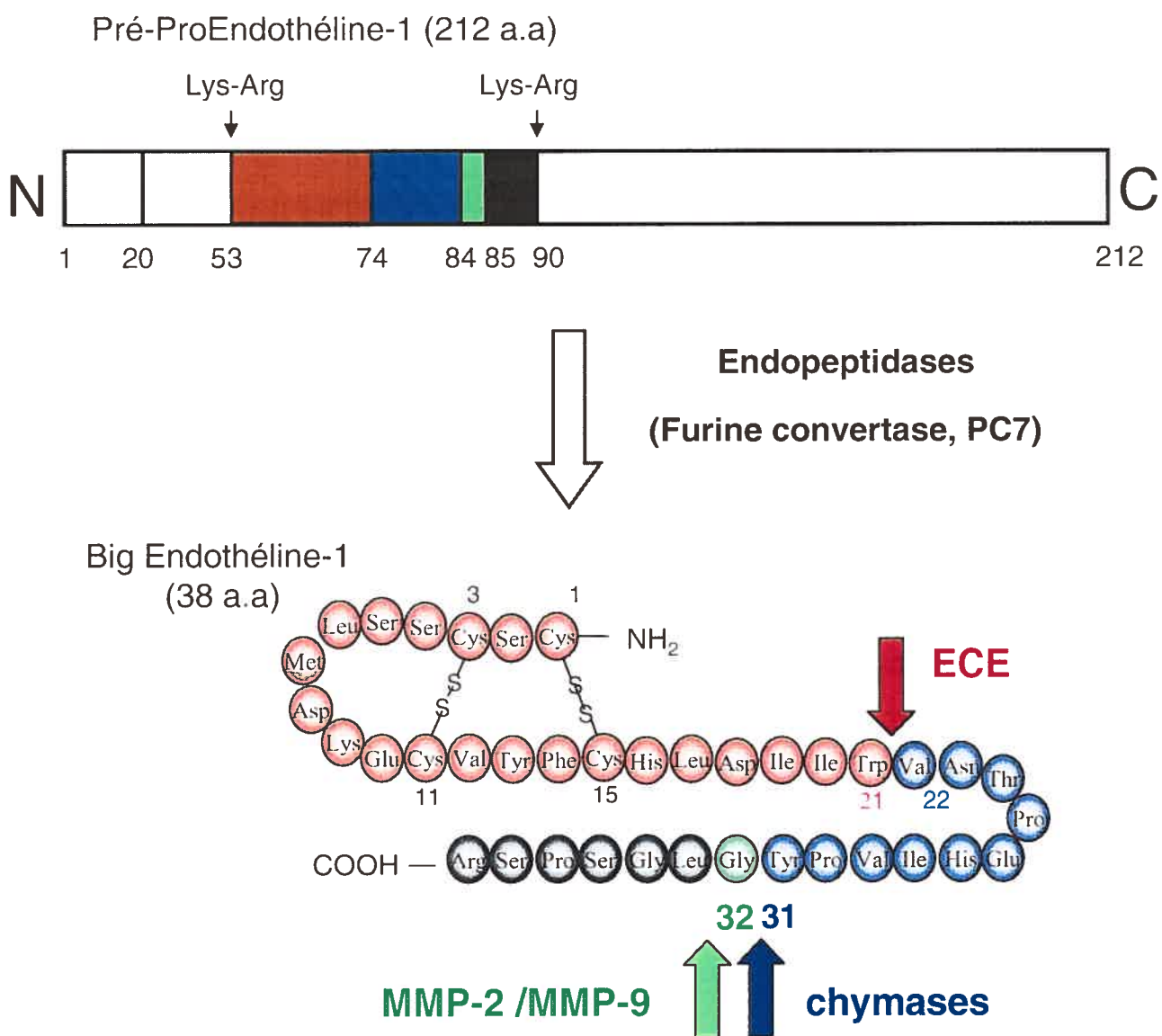
L'activité biologique des ET dépend de 3 éléments : i) des deux ponts disulfures, dont la rupture induit une disparition de la boucle intramoléculaire et diminue l'activité du peptide d'un facteur 100, ii) du tryptophane en position 21, indispensable dans la liaison entre l'ET et son récepteur et iii) de l'intégrité de l'hexapeptide-C terminal (Kimura *et al*, 1988).

### 4.3. Synthèse

#### 4.3.1. De la prépro-ET-1 à l'ET-1

Le gène de l'ET-1 est tout d'abord traduit en pré-proendothéline-1 contenant 212 acides aminés (Figure 3). La pro-ET-1 est formée par élimination d'un peptide de 18 aa du côté N-terminal. Cette dernière est ensuite clivée par la furine convertase ou la PC7, au niveau de la liaison Lys<sup>52</sup>-Arg<sup>53</sup> et la liaison Arg<sup>90</sup>-Arg<sup>91</sup> pour donner un peptide de 38 aa appelé à Big endothéline-1 (Big ET-1). Le clivage de la liaison Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> par l'enzyme de conversion des endothélines (ECE) de la Big ET-1 donne naissance à l'ET-1 qui est biologiquement active (Yanagisawa *et al*, 1988). Les trois isoformes ont été détectées dans le cytoplasme de plusieurs types cellulaires, suggérant une synthèse puis un stockage dans des vésicules intracytoplasmiques avant d'être sécrétées (Gui *et al*, 1993).

Figure 3. Synthèse de l'ET-1



Clivage effectué par	Représentation imagée	Forme d'ET-1
ECE		ET-1 [1-21]
Chymases		ET-1 [1-31]
MMP-2 / MMP-9		ET-1 [1-32]

#### 4.3.2. Conversion de la Big ET-1 par l'ECE

L'ECE a été isolée, purifiée et caractérisée pour la première fois à partir de l'endothélium vasculaire de l'aorte de porc (Ohnaka *et al*, 1993). Depuis sa découverte, sa localisation subcellulaire et la nature de son activité enzymatique sont encore controversées. L'identification et la caractérisation de l'ECE ont été démontrées par l'existence de nombreuses protéases cellulaires capables de cliver la Big ET-1 en ET-1 (Vijayaraghaven *et al*, 1990). On admet que l'activité de l'ECE est extracellulaire, puisque la Big ET-1 et l'ET-1 coexistent dans la circulation et dans les milieux de culture des cellules endothéliales (Ohwaki *et al*, 1993).

Le rôle de l'ECE est fondamental, puisque les effets vasoconstricteurs de l'ET-1 sont 140 fois plus élevés que ceux de la Big ET-1 (Rubanyi et Polokoff, 1994). Son activité est inhibée par le phosphoramidon (McMahon *et al*, 1991) et n'est pas modifiée par les inhibiteurs classiques des métalloprotéases, tels que le thiorpan et le captopril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) (Anh *et al*, 1992). Ces observations ont permis de caractériser l'ECE comme une nouvelle métalloprotéase dont le poids moléculaire est de 120 kDa (Shimada *et al*, 1994). Il existe trois isoformes de l'ECE : ECE-1, -2 et -3. L'ECE-1 est la forme la plus étudiée puisqu'elle est exprimée dans plusieurs systèmes (D'Orléans-Juste *et al*, 2003). La spécificité de l'ECE-1 pour les différents isoformes de la Big ET-1 est comme suit : Big-ET-1 > Big ET-2 > Big ET-3. Il existe quatre isoformes de l'ECE-1 : ECE-1a, -1b, -1c et -1d (Johnson *et al*, 1999). L'isoforme ECE-1a est localisé au niveau de la membrane plasmique ce qui permettrait un clivage de la Big ET-1 à l'extérieur de la cellule. Suite au clivage par l'ECE-1, l'ET-1 [1-21], composée de 21 acides aminés, est formée (Xu D *et al*, 1994).

Il est intéressant de noter que des souris homozygotes (-/-) pour le gène ECE-1 démontrent des défauts létaux du développement, tandis que pour le gène ECE-2, les souris homozygotes sont viables et démontrent aucune déficience de

développement (Yanagisawa *et al*, 1997). De plus, des études sur des souris homozygotes pour le gène de l'ET-1 (ET<sup>-/-</sup>) démontrent que l'ET-1 est essentielle dans le développement normal des tissus cranio-facial. Cette disruption génétique cause des malformations cardiaques sévères en influençant la post-charge cardiaque et la structure des gros vaisseaux. Ce phénotype se reproduit chez la souris knock-out du gène pour ET<sub>A</sub><sup>-/-</sup> (Yanagisawa *et al*, 1998). Les caractéristiques retrouvées chez ces souris transgéniques reflètent les déformations du syndrome CATCH 22 chez l'humain (Wilson *et al*, 1993). Le syndrome CATCH 22 présente un ensemble malformatif associant : une hypoplasie du thymus et des parathyroïdes, une cardiopathie congénitale de type conotruncal et une dysmorphie faciale discrète, mais caractéristique.

#### 4.3.3. Conversion de la Big ET-1 par d'autres enzymes

Récemment, il a été démontré que les MMP-2 et -9, dans les neutrophiles humains, clivent la Big ET-1 entre le Gly<sup>32</sup> et Lys<sup>33</sup> en générant une nouvelle forme très active de l'ET-1 constituée de 32 acides aminés, l'ET-1 [1-32]. Une production de l'ET-1 [1-32] génère une libération et une production de MMP-9, ce qui forme une boucle autocrine augmentant donc le nombre de clivage de la Big ET-1 en ET-1 [1-32]. La co-localisation des MMP-2 et -9 avec la Big ET-1 au site des tissus endommagés formerait l'ET-1 [1-32] en quantité plus importante (Fernandez-Patron, *et al*, 2001)

La Big ET-1 peut être clivée par l'activité enzymatique des chymases. Ces enzymes font parti de la classe des protéases à sérines, semblables à la chymotrypsine. Ils ont la capacité d'hydrolyser la liaison Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup> de l'angiotensine I pour produire l'angiotensine II, une puissante hormone vasoconstrictrice (Golding *et al*, 1998). Les chymases clivent la Big ET-1 en ET-1 [1-31] entre le Tyr<sup>31</sup> et le Gly<sup>32</sup> (Nakano *et al*, 1997). En clivant la Big ET-1, elles forment l'ET-1 [1-31] qui est plus efficace comme agent vasoconstricteur que la Big ET-1 et qui est similaire à l'ET-1 [1-21]. Des recherches ont démontré que l'ET-1

[1-31] pourrait subir par la suite un autre clivage pour générer l'ET-1 [1-21] et que ce clivage serait effectué par la NEP, enzyme membre de la même famille que l'ECE (Okishima *et al*, 2001 ; De Campo *et al*, 2002).

#### 4.4. Localisation cellulaire et tissulaire des isoformes de l'ET

Les ET sont principalement synthétisées par les cellules endothéliales (Howard *et al*, 1992). Cependant, leur présence est aussi démontrée dans des cellules non vasculaires, comme les monocytes (Ehrenreich *et al*, 1993), les fibroblastes (De Tejada *et al*, 1992), les ostéoblastes (Sasaki *et al*, 1993), les cellules cancéreuses (Battistini, *et al*, 1993) et les chondrocytes (Khatib *et al*, 1997). La distribution des ET-1 et ET-2 est plus large que celle de l'ET-3 :

	<u>ET-1 et ET-2</u>		<u>ET-3</u>
Poumon	Black <i>et al</i> , 1989	Tube digestif	Matsumoto <i>et al</i> , 1989
Rein	Kosaka <i>et al</i> , 1989	Cerveau	Matsumoto <i>et al</i> , 1989
Cœur	Bloch <i>et al</i> , 1989		
Os	Sasaki <i>et al</i> , 1993		
Tissu synovial	Miyasaka <i>et al</i> , 1992		
Cartilage	Khatib <i>et al</i> , 1997		

#### 4.5. Récepteurs de l'ET

##### 4.5.1. Isoformes

Il a été présumé comme plusieurs peptides bioactives que l'ET produit ses effets par l'entremise de récepteurs. Rapidement, il a été suggéré que les différents effets physiologiques et pharmacologiques ne pouvaient être contrôlés que par un type de récepteur. Trois types de récepteurs sont connus : les récepteurs de type A (ET<sub>A</sub>) (Arai *et al*, 1990), de type B (ET<sub>B</sub>) (Sakurai *et al*, 1990) et de type C (ET<sub>C</sub>) (Karne *et al*, 1993). Classiquement, le récepteur de type ET<sub>A</sub> répond aux trois

endothélines selon l'ordre de puissance suivants :  $ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3$ , alors que dans le cas du récepteur  $ET_B$  les trois isoformes sont équipotentes et l' $ET_C$  a une affinité élevée pour l' $ET-3$  (D'Orléans-Juste *et al*, 1996).

#### 4.5.2. Structure

Le gène du récepteur  $ET_A$  présente 8 exons et 7 introns et s'étend sur 40 kb. Chez l'homme, il est situé sur le chromosome 4 (Hosoda *et al*, 1992). Le gène du récepteur  $ET_B$  est constitué de 7 exons et de 6 introns. Il est situé sur le chromosome 13 et s'étend sur 24 kb (Arai *et al*, 1993). Le gène de l' $ET_A$  code pour une séquence de 427 aa et celui de l' $ET_B$  pour une séquence de 442 aa dont une portion de 20 aa représente le signal peptidique. Ils possèdent au moins 85% d'identité structurale avec les gènes identifiés chez d'autres mammifères, tels que le rat, le porc et le bœuf. En revanche, il n'y a que 59% de similitude entre les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  chez l'humain (Rubanyi *et al*, 1994). Le gène du récepteur  $ET_C$  a été cloné à l'heure actuelle uniquement chez la grenouille *Xenopus laevis* (Karne *et al*, 1993). Il code pour un peptide de 424 aa, et présente une homologie de 74% avec l' $ET_A$  et une homologie de 60% avec l' $ET_B$ . Les trois récepteurs possèdent 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G de type rhodopsine, une extrémité  $NH_2$ -terminal extracellulaire, impliquée dans l'interaction avec les ET, un certain nombre de résidus sérine et thréonine phosphorylables. Un motif commun aux trois récepteurs constitué de cys-leu-cys-cys-X-cys est situé à l'extrémité de la septième hélice et une extrémité  $COOH$ -terminale intracellulaire.

#### 4.5.3. Localisation

Les récepteurs de l'endothéline sont retrouvés principalement dans les cellules d'origine vasculaire, mais on les retrouve aussi dans les cellules non vasculaires. Au niveau de l'articulation, ils sont présents dans les cellules osseuses (Stern *et al*, 1995), les synoviocytes (Wharton *et al*, 1992) et les chondrocytes (Stojilkovic *et al*, 1994).

#### 4.6. Mécanismes d'action

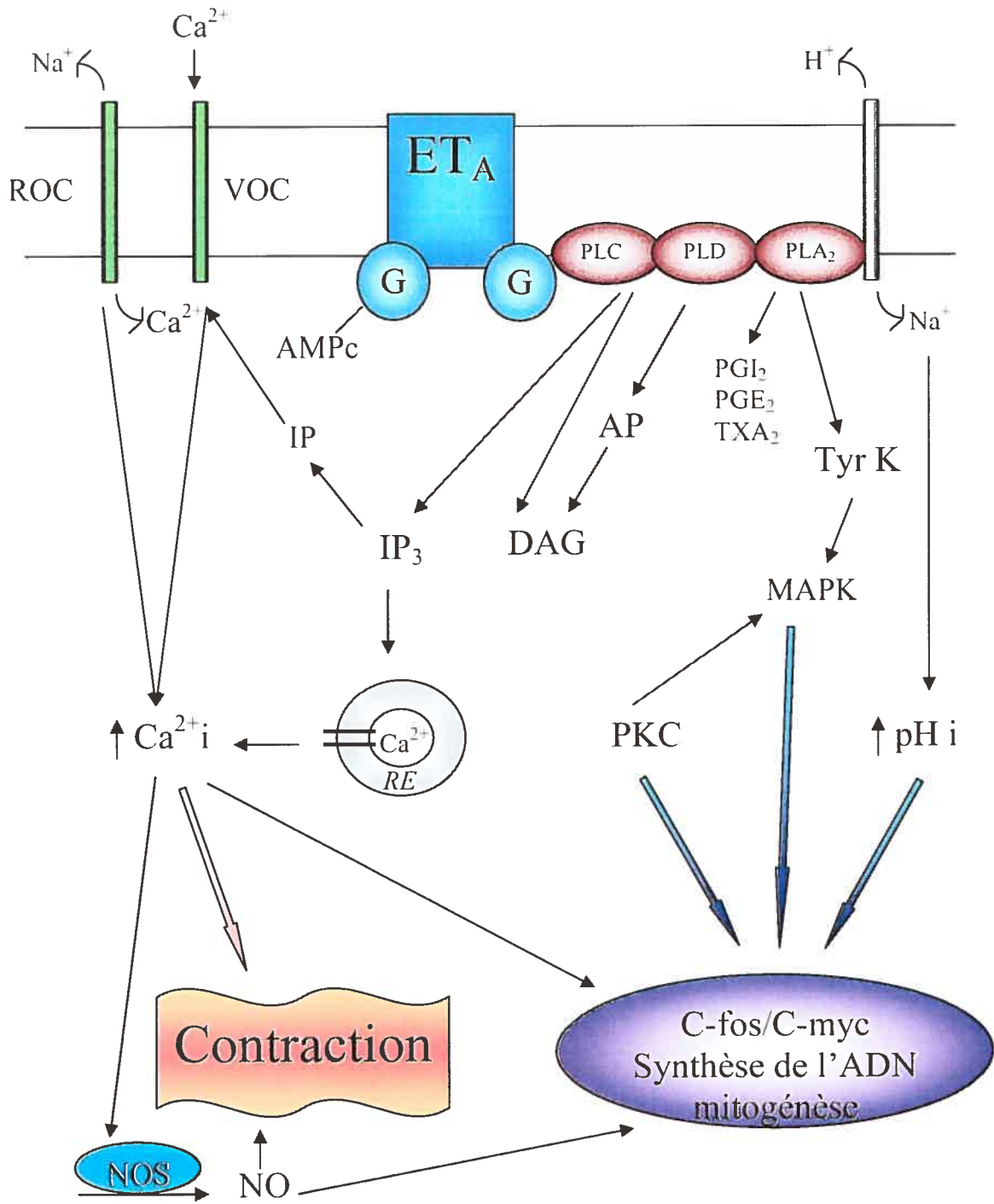
Les récepteurs des ET sont couplés à une protéine G. Leur activation aboutie à la réalisation des effets de l'ET qui peuvent être rapides (exemple : contraction des muscles lisses (Arai *et al*, 1990)) ou lents (exemple : la stimulation de la synthèse de l'ADN (Supatapone *et al*, 1989)) (Figure 4).

##### 4.6.1. Phospholipase C et mobilisation du calcium

L'interaction de l'ET avec son récepteur active la phospholipase C (PLC) via une protéine G et induit la formation d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et de diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> mobilise le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Resink *et al*, 1988) et le DAG stimule la protéine kinase C (Griendling *et al*, 1989). La mobilisation du calcium intracellulaire par l'ET n'est pas totalement liée à l'augmentation des IP<sub>3</sub> intracellulaires. Dans les cellules musculaires lisses de l'aorte, l'ET-1 et l'ET-3 mobilisent le calcium intracellulaire, mais seule l'ET-1 augmente l'IP<sub>3</sub> intracellulaire (Little *et al*, 1992). L'absence de l'activation de la PLC par l'ET-3 dans ces cellules explique en partie l'absence de l'implication du récepteur ET<sub>B</sub> dans la contraction (Gray *et al*, 1994). La mobilisation du calcium par l'ET n'est pas exclusif aux cellules vasculaires, cet effet de l'ET a été également mis en évidence dans les



Figure 4. Mécanisme d'action de l'ET-1



cellules non vasculaires comme les ostéoblastes (Takuwa *et al*, 1990) et les chondrocytes (Stojilkovic *et al*, 1994).

#### 4.6.2. Protéine kinase C

En stimulant la formation de DAG, l'ET-1 active la PKC et permet sa translocation du cytosol vers la membrane cellulaire (Lee *et al*, 1989). Les inhibiteurs de la PKC tels que la staurosporine, H7, calphostine C et R0 31-8220 atténuent l'effet vasoconstricteur (Shimamoto *et al*, 1992), l'effet inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Pietraszed *et al*, 1992) et l'effet stimulant de la sécrétion du facteur atrial natriurétique de l'ET (Irons *et al*, 1993). Dans les cellules musculaires du cœur, l'activation de la PKC par l'ET se traduit par une alcalinisation intracellulaire due à la stimulation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Kramer *et al*, 1991).

#### 4.6.3. Phospholipase A2

Dans le tissu pulmonaire, l'ET-1 induit la libération de la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) et du thromboxane A2 (De Nucci *et al*, 1988). Cet effet a été attribué à la mobilisation du calcium intracellulaire et à l'activation d'une protéine G (Burch *et al*, 1986). Cependant, l'hypothèse d'activation de la phospholipase A2 par l'ET, via la mobilisation du calcium ou par l'intermédiaire d'une protéine G, reste controversée.

#### 4.6.4. Phospholipase D et tyrosines kinases

L'activation de la phospholipase D (PLD) par l'ET, hydrolyse les phospholipides membranaires et libère l'acide phosphatidique. En présence de la PLD, l'acide phosphatidique est hydrolysé en DAG lequel active le PKC (Shukla *et al*, 1991). L'ET-1 active la PLD dans de nombreux types cellulaires, comme les cellules musculaires lisses (Liu *et al*, 1992) et les ostéoblastes (Suzuki *et al*, 1994). L'activation de la PLD par l'ET serait liée à l'activation des protéines tyrosines

kinases (PTK). Ces dernières seraient responsables de son effet mitogène (Boarder *et al*, 1994).

#### 4.6.5. Voie de l'AMPC

L'effet de l'ET sur la production de l'AMPC dépend du type de récepteurs majoritairement exprimés dans les cellules cibles. Lorsque les cellules expriment uniquement les ET<sub>A</sub>, l'ET-1 stimule la production de l'AMPC en activant la sous-unité stimulatrice de la protéine G. En revanche, dans les cellules ne possédant que les ET<sub>B</sub>, l'ET-1 inhibe cette production en stimulant la sous-unité inhibitrice de la protéine G (Eguchi *et al*, 1993).

#### 4.6.6. Monoxyde d'azote (NO) et GMPc

En plus de son action vasoconstrictrice, l'ET peut induire une vasodilatation en stimulant la libération de NO et de la PGE<sub>2</sub> par les cellules vasculaires endothéliales (De Nucci *et al*, 1988). La production de NO est liée à l'activation des récepteurs ET<sub>B</sub> (Hirata *et al*, 1993) laquelle augmente le calcium intracellulaire puis la formation des complexes calcium/calmoduline. Ces derniers sont des activateurs de la monoxyde d'azote synthase (NOS) (Hirata *et al*, 1993). À son tour, le NO active la guanylate cyclase soluble et induit la production de GMPc. Ce dernier réduit la concentration du calcium cytosolique et induit une vasodilatation. Le GMPc, par un mécanisme semblable, induit une inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses (Lincoln *et al*, 1989).

## 5. IMPLICATION DE L'ET-1 DANS LES TISSUES ARTICULAIRES

Depuis l'identification de l'ET-1 dans les cellules endothéliales vasculaires, de nombreux travaux ont montré que ce facteur avait des actions multiples dans différents tissus et organes. Un rôle possible dans le développement des maladies articulaires lui a été attribué (Messai *et al*, 2000 ; De-Melo *et al*, 1998a); cependant,

ce rôle n'a été que peu étudié. L'ET-1 a été mise en évidence dans le liquide synovial provenant d'articulations de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, d'arthrose et de goutte (Miyasaka *et al*, 1992) et elle serait augmentée lorsque comparée aux niveaux détectés chez les sujets normaux.

Dans la membrane synoviale, l'ET-1 est produite par les synoviocytes humains (Yoshida *et al*, 1998). Cette production locale suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'inflammation. Des études sur la voie de synthèse des dérivés de l'acide arachidonique et de la phospholipase A2 (Ferraira *et al*, 1989) ont aussi montré l'implication de l'ET-1 dans l'inflammation. L'ET-1 stimule aussi la production de fibronectine et de collagène dans les synoviocytes (Gutierrez *et al*, 1996). Les études *in vitro* sur les chondrocytes montrent qu'elle serait impliquée dans la modulation de la prolifération cellulaire ainsi que dans la synthèse des protéoglycanes et du collagène (Khatib *et al*, 1998). Ces effets sont médiés par ses récepteurs spécifiques (Khatib *et al*, 1998).

En effet, la présence dans les chondrocytes des récepteurs de forte affinité ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> ont été démontrée; les récepteurs de type ET<sub>A</sub> y étaient prédominants et sont exprimés davantage chez les animaux (rats) âgés (Khatib *et al*, 1998) suggérant que le vieillissement des chondrocytes est associé à la surproduction de l'ET-1 et du récepteur ET<sub>A</sub>. Fait intéressant dans les chondrocytes, l'interaction entre l'ET-1 et ses récepteurs se traduit par l'induction de deux effets opposés (la stimulation puis l'inhibition) sur l'activité mitotique des chondrocytes (Khatib *et al*, 1997) et sur la synthèse de protéoglycanes et du collagène (Khatib *et al*, 2002). Tel que démontré dans Khatib *et al*, (Khatib *et al*, 2002), ces effets sont liés à la multiplicité des médiateurs, dont l'apparition, puis l'accumulation déterminent l'effet de l'ET-1. En effet, ces résultats montrent que l'ET-1 exerce un effet biphasique sur le métabolisme chondrocytaire : une stimulation initiale (effet à court terme) fait place à une inhibition (effet à long terme) due à la production accrue de l'oxyde nitrique (NO) et du GMP cyclique (Khatib *et al*, 1997, 2002). Ainsi, on a suggéré que la stimulation de l'ET-1 induirait la production de l'AMPc via la PKC, qui induirait à

court terme la synthèse de l'ADN et des protéoglycanes (Khatib *et al*, 1998). Le mécanisme d'action de l'ET-1 dans les chondrocytes apparaît très complexe et impliquerait plusieurs seconds messagers.

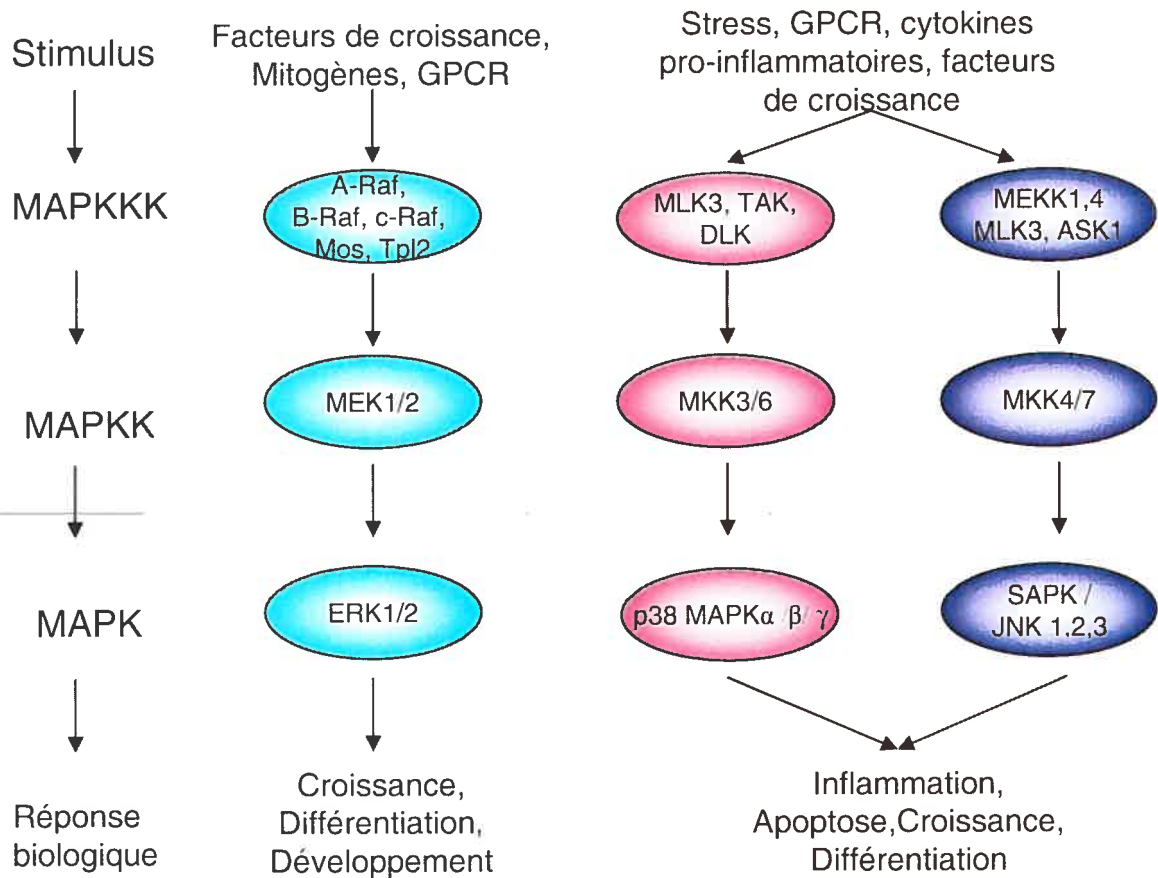
## 6. VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES

### 6.1. Mécanismes de régulation des MMPs par les cytokines pro-inflammatoires (voies de signalisation impliquées)

L'induction des métalloprotéases lors de l'arthrose a été surtout étudiée en réponse aux cytokines pro-inflammatoires incluant l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-17 et de manière générale, la voie des MAPK (mitogen-activated proteins kinases) a été suggérée comme étant un facteur clé (Firestein *et al*, 1999). Dans certains types cellulaires, la transmission des signaux extracellulaires en signaux intracellulaires est un processus très complexe qui requière l'activité des MAP kinases (mitogen-activated proteins kinases). L'activation de la MAPK requière une cascade de trois kinases qui consiste en une MAPKKK qui active une MAPKK qui stimule la phosphorylation de la MAP kinase. Suite à son activation, celle-ci peut phosphoryler plusieurs facteurs de transcription, substrats cytosoliques et membranaires et d'autres protéines kinases. Trois principales voies de signalisation intracellulaires MAPK ont été trouvées dans les cellules des mammifères : p44/42 (ERK1/2), p38 et SAPK/JNK (Figure 5).

Une fois que la dernière MAPK de la cascade est activée, elle se dirige vers le noyau où elle phosphoryle et active des facteurs de transcription spécifique tel que Elk-1 qui se lie au promoteur d'un grand nombre de gènes, dont c-fos et c-jun. Le produit de ces gènes interagit avec le facteur de transcription AP-1 dont l'action est médié par un motif de type fermeture éclair à leucines. AP-1 est un hétérodimère composé de c-Fos et c-Jun, deux composantes ayant un rôle

Figure 5. Cascade de signalisation des MAPK



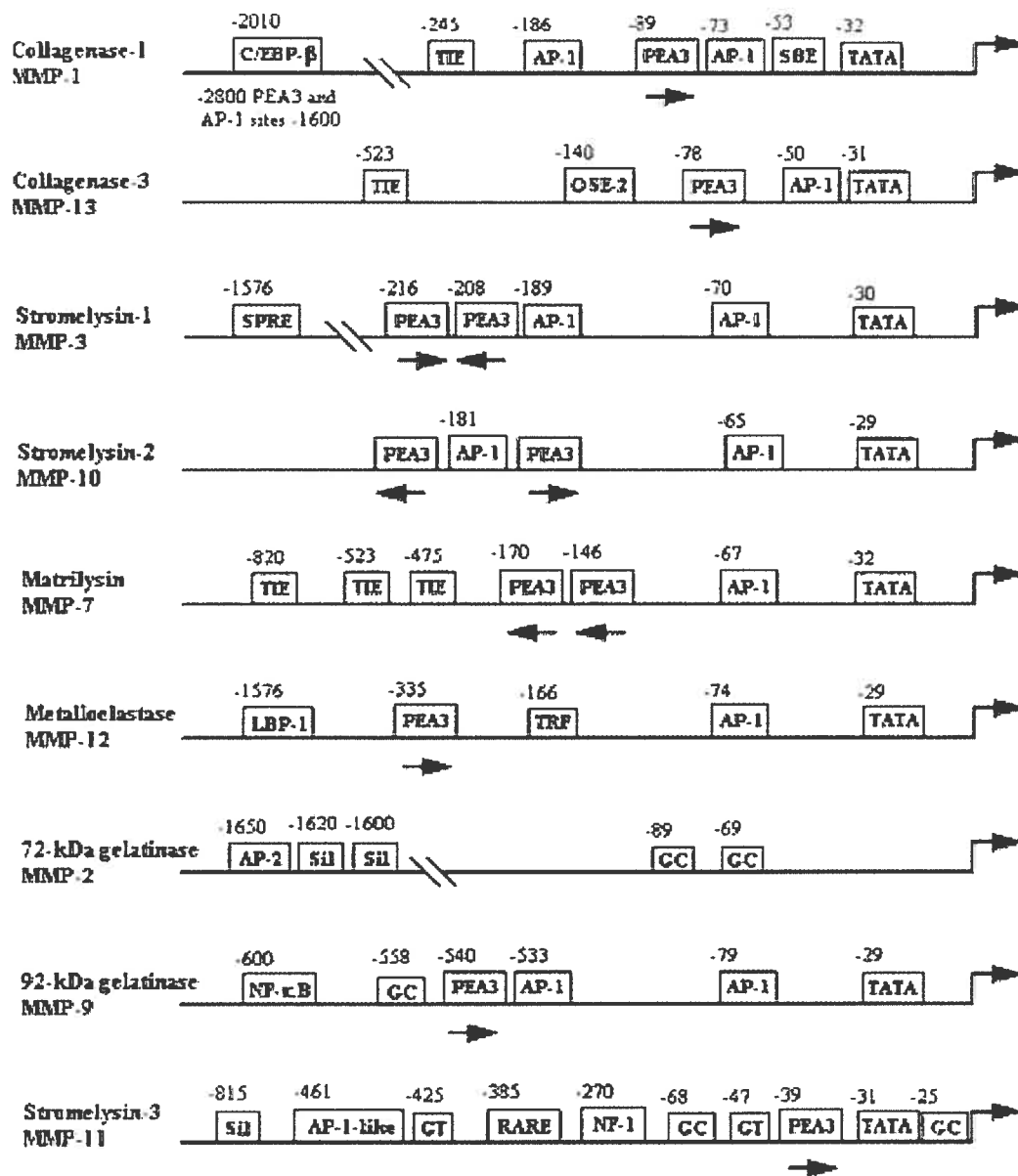
important dans la prolifération cellulaire. ATF-2 agit de la même façon que Elk-1, en activant c-Jun et c-Fos pour ainsi activer AP-1 (Mengshol *et al*, 2001).

Dans les fibroblastes murins provenant d'un modèle d'arthrite rhumatoïde, l'induction de la MMP-13 par l'IL-1 requière le facteur JNK (Mengshol *et al*, 2001). Aussi, l'activation de p38 MAPK par l'IL-1 utiliserait le facteur de transcription AP-1 pour induire la transcription de MMP-13 (Mengshol *et al*, 2001). Pour les fibroblastes humains, l'activation d'ERK  $\frac{1}{2}$  induirait l'activité du promoteur MMP-1 par l'entremise du facteur AP-1, tandis que l'activation de la p38 aurait un effet minime sur l'activité transcriptionnelle du gène MMP-1. L'activation de la p38 agirait en stabilisant les ARN messagers des MMP-1 et MMP-3 (Reunanen *et al*, 2002). De plus, les facteurs de la voie JNK ne semblent pas influencer la production de la MMP-1 (Brauchle *et al*, 2000). Il a aussi été démontré que le facteur NF- $\kappa$ B peut induire les MMP-1 et -3 indépendamment de l'activation de ERK  $\frac{1}{2}$  et de p38. (Mengshol *et al*, 2001).

Lorsque des chondrocytes OA sont stimulés au TNF- $\alpha$  ou à l'IL-1 $\beta$ , les voies de signalisation ERK, JNK et p38 ainsi que les facteurs de transcriptions AP-1 et NF- $\kappa$ B induisent la MMP-13 (Liacini *et al*, 2003 ; Mengshol *et al*, 2000). Il est à noter aussi qu'une inhibition des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B inhibe aussi la production de MMP-13, concluant à un rôle important pour ces facteurs dans la régulation de la MMP-13 (Liacini *et al*, 2003).

Le rôle de l'AP-1 dans la régulation des MMP-1, MMP-3 et MMP-13 est bien connu. Cependant, l'action unique du facteur NF- $\kappa$ B dans l'induction des MMP chez l'humain n'est pas certaine car les sites spécifiques pour ce facteur ne sont pas présents dans les promoteurs des MMP (figure 6). Il est fort possible qu'un cross-talk entre AP-1 et NF- $\kappa$ B dans le noyau permette la régulation des MMP, dès qu'une interférence arrive entre AP-1 et NF- $\kappa$ B, une inhibition dans l'expression des MMP en résulte (Liacini *et al*, 2002).

Figure 6. Promoteurs des MMP humains



*J. Westermarck, V-M. Kahari, FASEB J 13: 781-792, 1999*



Un autre facteur de transcription agit sur les MMP, le facteur ETS-1 qui se lie au site PEA-3 (polyoma enhancer A binding protein-3) se retrouvent près du site AP-1 sur toutes les MMP excepté la MMP-12. Les facteurs ETS sont des protéines hélice-boucle-hélice qui partagent un domaine hautement conservé reconnaissant le site riche en purine sur l'élément PEA-3 A/CGGAA/T (Sharrocks *et al*, 1997). Ces facteurs de transcription appartiennent à une famille d'environ 30 gènes. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes au cours de nombreux processus biologiques. La plupart des protéines ETS sont des activateurs de la transcription et le facteur ETS-1 a été démontré comme étant directement impliqué dans la régulation des MMP (Naito *et al*, 2002). Même si les protéines ETS ont la capacité d'activer un promoteur artificiel ne contenant que le site PEA-3, ils préfèrent former un complexe avec d'autres facteurs de transcription tel AP-1, avec lequel ETS fonctionne comme co-activateur (Sharrocks *et al*, 1997). Ces facteurs sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'hématopoïèse et du développement du système nerveux central, des os, du cartilage et des glandes mammaires (Pikkarainen *et al*, 2003). De plus, il joue un rôle important dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Naito *et al*, 2002).

## 6.2. ET-1 et voies de signalisation

L'ET-1 se lie au récepteur ET<sub>A</sub> exprimé sur les chondrocytes et débute une série d'évènements intracellulaires incluant l'activation de la phospholipase C et la phosphorylation de différentes kinases. Dans les myocytes cardiaques, après liaison au récepteur, la cascade ERK  $\frac{1}{2}$  est activée. Après un certain temps, deux protéines kinases, c - Jun et p38 MAPK, deviennent aussi activées. Le signal provenant du récepteur ET<sub>A</sub> est transmis à travers plusieurs autres protéines kinases, tel p90 (S6 kinase) (Sugden *et al*, 2003). Il a récemment été démontré que l'ET-1 utilise la voie MEK/ERK dans les neutrophiles humain, ainsi que dans les cellules myométriales du rat (Jozsef *et al*, 2002) (Robin, *et al*, 2002). L'activation de la p38 MAPK par l'ET-1 a été décrite dans les ostéoblastes qui exprimaient spécifiquement l'ARN messagers de la prostaglandine H synthétase

de type 2 (PGHS-2) (Windischhofer *et al*, 2002) et dans les myocytes cardiaques produisant le facteur natriotique de type B (Pikkarainen *et al*, 2003). L'utilisation des voies p38 et JNK dans les fibroblastes cardiaques a aussi été démontrée (Cheng *et al*, 2003).

L'ET-1 aurait un impact sur le facteur NF- $\kappa$ B en stimulant la dégradation de I $\kappa$ B et donc en activant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans les myocytes cardiaques (Sugden *et al*, 2003). NF- $\kappa$ B est ubiquitairement exprimé, peut-être inductible, et joue un rôle dans la survie des cellules, l'adhésion cellulaire, l'inflammation, la différenciation, la prolifération cellulaire et la croissance (Shishodia *et al*, 2002). Les complexes actifs NF- $\kappa$ B sont composés de dimères de la famille des polypeptides REL : p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), c-Rel, v-rel, Rel A (p65) et Rel B (Baeuerle *et al*, 1996). Tous les membres de la famille Rel peuvent se lier à l'ADN, seulement p65, c-Rel et Rel-B contiennent un domaine de transactivation. Dans la majorité des cellules au repos, NF- $\kappa$ B est retenu dans le cytoplasme en étant lié à des protéines inhibitrices (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p105, p100) qui bloquent la séquence de localisation nucléaire. NF- $\kappa$ B est activé suite à une réponse à divers stimuli, ce qui va provoquer une dissociation du facteur I $\kappa$ B $\alpha$  qui sera phosphorylé et dégradé. Cette dissociation démasque la séquence de localisation nucléaire de NF- $\kappa$ B permettant à NF- $\kappa$ B d'entrer dans le noyau et de se lier aux éléments  $\kappa$ B-régulateurs. La phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  est une étape critique dans l'activation de NF- $\kappa$ B, et cette étape est catalysée par le complexe I $\kappa$ B $\alpha$  kinase. Le facteur NF- $\kappa$ B est activé par l'ET-1 dans les monocytes humains THP-1, ceci supporte le rôle de l'ET-1 dans le développement de l'inflammation dans les vaisseaux lors de l'athérosclérose (Wilson *et al*, 2001).

Dans les myocytes cardiaques, il a été démontré que l'ET-1 agit sur le facteur de transcription ETS-1. Ce facteur de transcription se lie au site à la séquence EBS. Pikkarainen et son équipe ont démontré que des cellules stimulées par l'ET-1 induisent la liaison de facteurs ETS sur le site EBS et que cette liaison est

essentielle pour l'activation de la transcription de l'ET-1 (Pikkarainen *et al*, 2003). De plus, le facteur ETS-1 est augmenté par l'ET-1 ce qui a été démontré dans des cellules endothéliales (Naito *et al*, 2002).

### 6.3. ET-1 et MMP – voies de signalisation

Le mécanisme d'induction des MMP par l'ET-1 est très peu connu étant donné que la découverte de l'interaction entre le système endothéline et les MMP est très récente, de plus il n'a jamais été élucidé dans les chondrocytes articulaires. Dans les neutrophiles humains, il a été montré que l'ET-1 [1-32] en se liant au récepteur ET<sub>A</sub> active la phosphorylation de l'ERK via Ras, Raf-1 et MEK. L'utilisation de l'inhibiteur du facteur MAPKK, le PD98059, diminue le relâchement des gélatinases indiquant ainsi que les MMP-2 (gélatinases A) et MMP-9 (gélatinases B) sont induites via ces voies de signalisation intracellulaires utilisées par l'ET-1 pour induire la synthèse des MMP (Fernandez-Patron *et al*, 2001).

Dans les myocytes cardiaques, il a été montré que l'ET-1 interagit avec le facteur de transcription ETS-1 (Pikkarainen *et al*, 2003) qui est connu pour son implication dans l'expression et la régulation des gènes des MMP. En effet, les facteurs de transcription ETS sont associés avec une réponse rapide d'induction de la voie de PKC et/ou la PTK par de nombreux mitogènes et facteurs chemoattractants (Naito *et al*, 2002).

## 7. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'objectif général est de démontrer l'hypothèse suggérant que l'ET-1 jouerait un rôle dans la physiopathologie de l'arthrose humaine en tant que facteur favorisant le catabolisme du cartilage. Ceci n'exclue pas la possibilité que l'ET-1 pourrait aussi agir sur certains facteurs anaboliques. Toutefois, notre étude a été ciblée sur les effets de l'ET-1 dans le système MMP/TIMP.

Dans ce travail, nous avons exploré les effets de l'ET-1 et de la Big ET-1 sur les principaux facteurs cataboliques impliqués dans la dégradation du cartilage humain arthrosique. Premièrement, nous avons exploré la synthèse locale (*in situ*) de l'ET-1 dans la membrane synoviale normale et provenant des patients arthrosiques. Par la suite, nous avons étudié l'effet de l'ET-1 sur la MMP-1, MMP-13 et MMP-3. L'effet de l'ET-1 a été exploré au niveau de l'expression, la synthèse, la sécrétion et l'activité biologique des MMP.

Puis, nous avons déterminé les voies de signalisation empruntées par l'ET-1 et la Big ET-1 pour contrôler la production des MMP étudiés. Les voies de signalisation intracellulaires activés par l'ET-1 ont été étudiés sur la production des MMP-1 et MMP-13, tandis que les voies de signalisation de la Big ET-1 pour augmenter la production de la MMP-3.

## **CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE**

## 1. SÉLECTION DE TISSUES

Les tissus humains sont obtenus lors de chirurgie de remplacement du genou. Le protocole de recherche et l'utilisation de tissus pour la recherche sont approuvés par le comité d'éthique en recherche de l'hôpital Notre-Dame à Montréal. Les cartilages sont obtenus à partir de 12 patients OA ( $58 \pm 6$  années, moyenne  $\pm$  SEM) subissant un remplacement total du genou. Pour les cartilages normaux, les tissus sont prélevés en autopsie 24h post-mortem. Un morceau de chaque tissu est inclus en paraffine puis coupé et coloré avec le Safranine O et le fast green, puis évalués en utilisant l'échelle de Mankin (Mankin *et al*, 1971). Seuls les tissus correspondants à un degré modéré de sévérité d'arthrose (Mankin 3-7) sont intégrés dans ces recherches.

## 2. CULTURE CELLULAIRE

Le cartilage est prélevé au niveau du plateau tibial médial, au point d'appui de l'articulation. Chaque spécimen est disséqué, rincé et digéré pour obtenir des chondrocytes (Reboul *et al*, 1996). La digestion du cartilage commence par une incubation d'une heure dans la pronase 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) et en présence d'un mélange de pénicilline 100U/ml et de streptomycine 100 $\mu$ g/ml (PEN/STREP 1% ; Gibco BRL). Puis le tissu est digéré pendant six heures dans du collagénase 2 mg/ml (type IA; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) à 37°C et les cellules sont récupérées par filtration et centrifugation. Par la suite, les cellules sontensemencées à haute densité dans des contenants de culture et cultivées jusqu'à confluence dans du milieu de culture DMEM contenant du sérum de veau fœtal à 10% décomplémenté (Hyclone, Logan, UT) et du mélange PEN/STREP 1%, à 37°C dans un atmosphère humidifié de 5%CO<sub>2</sub>/95% air. Les cellules utilisées dans cette étude sont des cellules de premier passage qui sont incubées pendant 24 heures dans du DMEM 0,5% puis stimulées dans du DMEM 2,5% pendant 24 heures pour l'étude des

MMP et 5, 10, 15 minutes pour l'étude des kinases. Les milieux de culture sont récoltés pour l'analyse des protéines sécrétées par Western blotting ou/et par ELISA (enzyme linked immunosorbant assay). Quant aux cellules elles-mêmes, elles sont recueillies dans du Trizol pour l'extraction des ARN messagers totaux.

### 3. ARN

#### 3.1. Extraction d'ARN

L'ARN total des chondrocytes en culture est extrait avec le réactif Trizol (Gibco-BRL) selon la technique couramment utilisée au laboratoire (Reboul *et al*, 1996; Faour *et al*, 2001; Moldovan *et al*, 2000) et selon les spécifications du fabricant. L'ARN est suspendu dans de l'eau stérile et est dosé par la méthode du Ribo-Green (Jones *et al*, 1998). Puis l'intégrité de l'ARN est vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % et de tampon MOPS (Roche). Les ARN ainsi préparés sont par la suite utilisés pour Northern Blot et /ou RT-PCR.

#### 3.2. RT-PCR

Pour la méthode RT-PCR, des aliquots de 2 µg d'ARN sont chauffés 5 minutes à 65°C et transcrits en ADN par la reverse transcriptase (Moloney murine leukemia-virus ; MMLV-RT, Invitrogen). La technique RT-PCR pour l'ET-1 est basée sur la méthode de Lange *et al*, 1994.

Les amorces ET-1 utilisées génèrent un produit amplifié de 304 paires de bases :

amorce sens : 5'-GTCAACACTCCCGACCACGTT-3',

amorce anti-sens : 5'-CTGGTTTGTCTTAGGTGTTCTC-3'.

Les amorces GAPDH utilisées génèrent un produit amplifié de 319 paires de bases :

amorce sens : 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3',

amorce anti-sens : 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3'.

### 3.3. Northern Blotting

L'ARN (5 µg) extrait à partir de cellules cultivées en présence d'un des trois peptides (ET-1 (10 nM), Big ET-1 (10 nM) ou interleukin-1β (IL-1β) (10 pg/ml)) est migré sur un gel de 1.2% d'agarose-formaldehyde et transféré par électrophorèse à une membrane de nylon (Hybond-N; Amersham, Oakville, Ontario, Canada) dans un tampon de 10 mM sodium acétate (pH 7.8) contenant 20 mM Tris et 0.5 mM EDTA pendant une nuit à 4°C. L'ARN est ensuite lié à une membrane par exposition à l'UV. Après une pré-hybridation de 24 heures à 68°C dans du tampon de pré-hybridation, l'hybridation est effectuée à la même température avec les sondes suivantes :

- pour la MMP-1 : la sonde MMP-1 préparée à partir de ADNc MMP-1 humaine a été généreusement fournie par Dr. Dylan R. Edwards (University of Calgary, AB, Canada)
- pour la MMP-3 : la sonde MMP-3 a été préparée à partir de ADNc MMP-3 humaine, donnée généreusement par Dr. Marmer (Université de Washington, États-Unis). La séquence de la sonde sens utilisé est 5'- GAA AGT CTG GGA AGA GGT GAC TCC AC -3' et celle de la sonde anti-sens est 5'- CAG TGT TGG CTG AGT GAA AGA GAC CC -3'.
- pour la MMP-13 : la sonde MMP-13 utilisée consiste à la séquence totale du gène de 1.4kb, et à la séquence de 490 bp de la région 3'-non-transcrite, cloné dans un vecteur pGEM-T (Reboul *et al*, 1996).

Les sondes d'ARN sont transcrites et marquées à la digoxigenin-11-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (DIG-11-UTP) (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada) selon les spécifications du manufacturier. La détection est effectuée par



chemiluminescence avec un substrat CDP (Chemiluminescence methods for detection of probes) (Roche Diagnostic) et révélée par l'exposition à de films Kodak X-AR5 (Eastman Kodak, Rochester NY). Après la première hybridation, la membrane est strippée et rehybridée avec la sonde libellée à la DIG spécifiquement pour l'ARN déshydrogénase glyceraldehyde-3 phosphate (GAPDH) qui est utilisée comme gène de référence. Les densités optiques des autoradiographes sont déterminées utilisant le Chemilmager 4000 (Alpha Innotech, San Leandro, CA) système d'imagerie, et les niveaux d'ARN messagers de la GAPDH sont comparés à ceux des sondes spécifiques des MMP. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage du contrôle pour chaque spécimen.

#### **4. IMMUNOHISTOCHEMIE**

Les cartilages sont directement traités pour l'immunohistochimie tels que décrit dans Moldovan F *et al*, 1997 et Saha N *et al*, 1999. Des coupes de 5 µm sont réalisées à partir des tissus inclus en paraffine. Les lames sont ensuite déparaffinées dans 3 bains successifs de toluène et réhydratées dans des bains d'alcool (100%, 90%, 70% et 50%) puis dans de l'eau et du PBS 1X (pH 7,4). Les coupes de cartilage subissent un traitement enzymatique, c'est-à-dire une incubation de 90 minutes en présence de la chondroïtinase ABC (0,25 u/mL ; Sigma-Aldrich) à 37°C pour couper la chondroïtine sulfate et ainsi faciliter la pénétration de l'anticorps. Un chauffage peut également être fait aux coupes de cartilage et de membrane synoviale à 65°C pendant 20 minutes dans un tampon citrate 10mM à pH 6,0, pour la détection des antigènes intracellulaires. Suite aux lavages au PBS 1X, les lames sont traitées au Triton 0,3% (Sigma) qui est un détergent servant à perméabiliser les coupes. Elles sont ensuite traitées au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 2% dans du méthanol pendant 30 minutes pour inhiber l'activité de la peroxydase endogène. Après un blocage de 60 minutes avec du sérum normal bloquant (trousse Vectastain), les lames sont incubées avec différents anticorps à différentes dilutions pendant toute une nuit à 4°C dans un environnement humidifié. Les anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux

anti-ET-1 (5 µg/ml) (Research Diagnostic inc. Flanders, NJ) et des anticorps monoclonaux anti-phospho-p38 (5 µg/ml) (New England Biolabs LTD, Mississauga, Ontario).

Une incubation est faite avec l'anticorps secondaire lié à la biotine pendant 45 minutes à température ambiante, puis avec le substrat avidin-biotin complexe (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) pendant 45 minutes. La couleur est développée avec le substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine ; DAKO; Mississauga, Ontario, Canada) contenant du peroxyde d'hydrogène, puis les lames sont contre-colorées avec le nuclear fast red stain (Digene Diagnostics Inc., Silver Spring, MD). L'évaluation des chondrocytes colorés positivement est effectuée selon les protocoles publiés précédemment (Moldovan *et al*, 1997; Saha *et al*, 1999). Pour tous les spécimens, 6 champs microscopiques sont observés (X40; Leitz Diaplan, Wetzlar, Germany) : 3 champs dans la zone superficielle et 3 champs dans la zone profonde. Par la suite, le nombre total de chondrocytes et le nombre de chondrocytes montrant un signal positif pour l'anticorps primaire sont notés. Chaque lame est évaluée à double-aveugle avec une variation maximale de 5%.

La spécificité de la coloration est évaluée par 3 contrôles :

- i) un sérum contenant un excès de 10 molaires du peptide recombinant ET-1 (Sigma-Aldrich),
- ii) omission de l'anticorps primaire,
- iii) substitution de l'anticorps primaire avec un IgG non-immunologique (Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands).

## 5. DÉTERMINATION DES FRAGMENTS DE COLLAGÈNE DE TYPE II

Les expériences sont effectuées avec du cartilage OA cultivé en présence ou absence d'ET-1 humaine recombinante (10 nM, Sigma-Aldrich) pour 7 jours. À la fin de la période d'incubation, les milieux et les explants sont récoltés et les

fragments de collagènes de type II sont déterminés. Chaque explant de cartilage est divisé en deux parties : la première partie est utilisée pour l'extraction de protéines et la deuxième est fixée dans le paraformaldehyde et est incluse dans la paraffine pour l'immunohistochimie. Pour l'extraction de protéines, le cartilage est pesé, coupé et homogénéisé dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl, 10 nM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Brij 35, et 2M guanidine hydrochloride, pH 7,5. L'homogénat est incubé toute la nuit à 4°C avec agitation. Après une centrifugation de 3000 g pendant 10 minutes, les extraits sont dialysés dans du 50 nM Tris-HCl pH 7,5 avec trois changements de tampon. Les fragments de collagène de type II sont quantifiés dans les extraits de cartilage et dans le milieu conditionné par un ELISA spécifique (CartiLaps, Nordic Bioscience A/S, Herlev, Denmark) (Christgau *et al*, 2001). Brièvement, cette quantification a été réalisée à l'aide d'un test ELISA utilisant l'anticorps monoclonal reconnaissant une séquence linéaire de 6 acides aminés de la région centrale du C-télopeptide du collagène de type II. Le même anticorps monoclonal reconnaissant ce fragment de collagène de type II est utilisé pour la détection immunohistochimique (2 µg/ml), qui est réalisée en utilisant la méthode avidin-biotin complexe (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). Les résultats sont exprimés selon la moyenne ± SEM pour la Cartilaps immuno-assay et selon les sections représentatives des tissus pour l'immunohistochimie.

## 6. ELISA

Les chondrocytes OA sontensemencés dans des plaques de 24 puits en présence ou en absence d'ET-1 (0-100 nM). Après 24 heures d'incubation, les milieux de culture sont récoltés et les niveaux des protéines MMP-1, MMP-13 et TIMP-1 sont déterminés dans le milieu de culture. Les trousse de dosage ELISA suivantes sont utilisées : MMP-1, MMP-13 et TIMP-1. La trousse de dosage ELISA (Amersham Biosciences Corp., Baie d'Urfé, QC, Canada) pour la MMP-1, détecte spécifiquement la MMP-1 humaine, c'est-à-dire la MMP-1 active, la pro-MMP-1 et la MMP-1 complexée à des inhibiteurs tel la TIMP-1. Le seuil de détection minimale est de 1,7 ng/ml et il n'y avait pas de croisement avec les MMP-3, MMP-

2 et MMP-9. La trousse de dosage de MMP-13 (R&D Systems Inc, MN, USA) est également spécifique de la forme activée et de la pro-forme de la protéine et la sensibilité du dosage est de 0,032 ng/ml et n'a pas d'activité hétérospécifique avec les MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 et la MT1-MMP. Les résultats sont exprimés en ng/ml/5x10<sup>5</sup> cellules et représentent les moyenne ± SEM obtenus pour six expériences indépendantes.

### 6.1. Étude des voies de signalisation activées par l'ET-1

Les chondrocytes OA sont pré-incubés pour 30 minutes avec différents inhibiteurs puis incubés avec de l'ET-1 (10 nM) pour une période additionnelle de 24 heures. Après les incubations, les milieux de culture sont collectés et leur niveau de protéines est déterminé avec les trousse ELISA spécifiques des protéines MMP-1 et MMP-13. Les différents inhibiteurs de protéines kinases suivants ont été utilisés :

**Tableau 3 : Inhibiteurs utilisés pour ELISA**

Inhibiteur	Concentration	Rôle	Provenance
SB 202190	1 µM	Inhibiteur de la MAPK p38	Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA
PD 98059	10 µM	Inhibiteur sélectif de la MEK1/2	Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA
Wortmannin	100 nM	Inhibiteur de la PI3K	Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA
KT5720	4 µM	Inhibiteur de la PKA	Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA
Ly 83583	2 µM	Inhibiteur de la guanylate cyclase	Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA

La concentration des inhibiteurs utilisée dans cette étude est basée sur des résultats déjà publiés (Notoya *et al*, 2000; Reboul *et al*, 2001; Jovanovic *et al*,

1998; Khatib *et al*, 2002). Les résultats sont exprimés en ng/ml/5x10<sup>5</sup> cellules et représentent les moyennes  $\pm$  SEM obtenus pour six expériences indépendantes.

## 7. ACTIVITÉ DES MÉTALLOPROTÉASES

### 7.1. Détermination de l'activité des collagénases

L'activité des collagénases est mesurée dans le milieu de culture des chondrocytes OA ayant été incubés avec ou sans ET-1 (10 nM) pour 24 heures. L'activité des collagénases est déterminée à l'aide du télopeptide de collagène de type II couplé à la FITC (Chondrex, Redmond, WA). Une unité d'activité collagénase est définie comme étant le clivage de 1  $\mu$ g de collagène par heure. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM pour 8 expériences indépendantes.

### 7.2. Détermination de l'activité de la MMP-3

Les milieux de culture des chondrocytes OA stimulés avec ou sans Big ET-1 (10nM) pendant 24 heures sont incubés avec de la 4-aminophenylmercuric acétate (APMA) solution (12mM) (Sigma) pour activer les métalloprotéases latentes. Puis un substrat synthétique, l'Azocoll (Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA) est ajouté. Pour les contrôles négatifs, une solution EDTA (0.3mM) est ajoutée car elle est un inhibiteur de l'activité des MMP. Les tubes sont complétés avec le tampon MES (MES buffer : MES (100mM), CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O (10mM), NaCl (150mM) et Brij 35 (0.05%), pH 5.0). Les tubes sont incubés à 37°C pour 72 heures, puis centrifugés (12 000 X g for 10 minutes). Les échantillons sont transférés dans une plaque de 96 puits pour la lecture de l'absorbance qui est effectuée à 520 nm (Chavira *et al*, 1984).

## 8. DOSAGE D'OXYDE NITRIQUE (NO)

Afin d'examiner les effets de l'ET-1 et de la Big ET-1 sur la production de NO, une courbe dose-réponse est effectuée en incubant des chondrocytes OA durant 24 heures à des concentrations croissantes d'ET-1 (0-100nM) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et de Big ET-1 (0-100nM) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Les nitrites sont ensuite mesurés dans les milieux de culture conditionnés par le biais d'une méthode spectrophotométrique basée sur la réaction de Griess (Green *et al*, 1982). La production d'oxyde nitrique est également évaluée en présence de plusieurs inhibiteurs. Les chondrocytes sont pré-incubés durant 30 minutes avec les inhibiteurs suivants (tous de chez Calbiochem EDM Biosc. Inc, San Diego, CA), puis avec soit l'ET-1 (10 nM) ou la Big ET-1 (10nM) pour une période additionnelle de 24 heures.

**Tableau 4 : Inhibiteurs utilisés lors de stimulation pour dosage NO**

Inhibiteurs	Concentration	Rôle	Stimulé avec
L-NIL	0-50 $\mu$ M	inhibiteur de l'iNOS	ET-1
Bay 117802	10 $\mu$ M	inhibiteur de I $\kappa$ B- $\alpha$	Big ET-1
Ly 82582	2 $\mu$ M	inhibiteur de cGMP	Big ET-1 ou ET-1
SB 202190	1 $\mu$ M	inhibiteur de p38 MAPK	ET-1
PD 98059	10 $\mu$ M	inhibiteur sélectif de MEK1/2	ET-1
Wortmannin	100 nM	inhibiteur de PI3K	ET-1
KT5720	4 $\mu$ M	inhibiteur de PKA	ET-1

Les concentrations indiquées des différents inhibiteurs sont basés sur des résultats déjà publiés (Khatib *et al*, 2002 ; Jovanovic *et al*, 1998).

## 9. ANALYSE PAR WESTERN BLOT

La détection des protéines est effectuée à partir de milieux de culture de chondrocytes et/ou de lysats cellulaires. Certains milieux sont additionnés de mercaptoéthanol pour rompre les ponts disulfures et ainsi dissocier certains complexes de protéines. Les chondrocytes sont incubés en absence (contrôle) ou en présence de 10 nM ET-1 ou 10 nM Big ET-1. Dans certaines expériences, les chondrocytes sont pré-incubés pendant 30 minutes avec les inhibiteurs (tous de Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA) puis sont stimulés avec de l'ET-1 ou de la Big ET-1. Voici les différents inhibiteurs qui ont été utilisés.

**Tableau 5 : Inhibiteurs utilisés pour analyse par Western blot**

Inhibiteurs	Concentration	Rôle
SB 202190	1 $\mu$ M	inhibiteur de la p38 MAPK
PD 98059	10 $\mu$ M	un inhibiteur sélectif de MEK1/2
SN50	100 nM	inhibiteur de la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B
Bay117802	10 $\mu$ M	inhibitor of I $\kappa$ B- $\alpha$
NS 398	10 $\mu$ M	inhibitor of COX-2
8-bromo-cGMP	50 $\mu$ M	inhibiteur de la transcription d'aggrécane et de collagène de type II
KT5720	4 $\mu$ M	un inhibiteur de la PKA
Ly 83583	2 $\mu$ M	inhibiteur de la guanylate cyclase
Forskoline	5 $\mu$ M	activateur de l'adenylate cyclase
Phosphoramidon	100 $\mu$ M	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'ET

Les cellules sont lysés dans un tampon de lyse (25 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml pepstatine, 10  $\mu$ g/ml leupeptine, pH 7.5). La concentration des lysats cellulaires est déterminée par dosage des protéines selon la méthode Bradford décrit par Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. 10  $\mu$ g de

protéines sont utilisés pour l'électrophorèse SDS-PAGE (système Bio-Rad) dans des mini-gels comprenant un gel de compaction de 4% et un gel de séparation 10% sulfate de sodium dodecyl (SDS). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) par électroblotting. Les membranes sont immergées toute la nuit dans un tampon bloquant 2% Super Block Blocking buffer (Pierce, Rockford, IL) et ensuite rincées et incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire. Les différents anticorps primaires utilisés pour ces études sont les suivants:

**Tableau 6 : Anticorps primaires utilisés pour analyse par Western blot**

Anticorps	Types d'anticorps primaire	Dilution	Provenance
MMP-3	monoclonal	1/1000	New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada
ETS-1	polyclonal	1/2000	Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA
iNOS	polyclonal	1/1000	Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA
NF- $\kappa$ B p65	Polyclonal	1/1000	Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA
Phospho-p38	Polyclonal	1/1000	New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada
P38-total	polyclonal	1/1000	New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada
Phospho-p42/44	monoclonal	1/5000	New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada
Phospho-Akt	polyclonal	1/2000	Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA



Une fois incubées avec l'anticorps primaire, les membranes sont lavées et réincubées avec un anticorps secondaire (anti-IgG de souris ou de lapin) conjugué à la peroxydase durant 1 heure à 4°C avec les concentrations suivantes :

**Tableau 7 : Anticorps secondaires utilisés pour analyse par Western blot**

Anticorps primaire	Types d'anticorps secondaire correspondant	Dilution de l'Ac secondaire
MMP-3	Chèvre anti-souris	1 / 40 000
ETS-1	Chèvre anti-lapin	1 / 50 000
iNOS	Chèvre anti-lapin	1 / 50 000
NF- $\kappa$ B p65	Chèvre anti-lapin	1 / 45 000
Phospho-p38	Chèvre anti-lapin	1 / 40 000
P38-total	Chèvre anti-lapin	1 / 40 000
Phospho-p42/44	Chèvre anti-souris	1 / 25 000
Phospho-Akt	Chèvre anti-lapin	1 / 40 000

Les protéines sont ensuite révélées avec le substrat Super Signal (Pierce) effectuée à l'aide de films (Kodak Biomax) selon les instructions du manufacturier.

## 10. APOPTOSE

L'apoptose est analysé chez des chondrocytes OA ensemencés dans les lames Lab-Tec (Nalge Nunc International, Naperville IL). Lorsqu'à confluence, les milieux sont retirés et les cellules sont incubés pour 72 heures à 37°C dans du DMEM contenant 2.5% de sérum de veau fétal avec ou sans ET-1 (10nM). Les cellules apoptotiques sont détectées par une coloration *in situ* utilisant la méthode TUNEL (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD). Les nucléotides biotinylées sont détectés en utilisant une peroxydase horseradish streptavidine (POD) et révélés avec la DAB (Dako Diagnostics). Pour déterminer la spécificité de la coloration, deux contrôles sont utilisés : 1) un contrôle négatif où le TdT a été omis ; et 2) un contrôle positif

où les cellules ont été pré-traités pendant 15 minutes à 37°C avec DNase I (0.1 µg/ml). De plus, la détection immunocytochimique des protéines pro-apoptotiques Bad et anti-apoptotiques Bcl2 est effectuée utilisant des anticorps spécifiques pour anti-Bad et anti-Bcl2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Les cellules positives sont détectées par un deuxième anticorps IgG anti-souris conjugué à la POD et révélé avec le DAB. De façon à évaluer l'effet protecteur ou non de l'ET-1 sur les chondrocytes OA, des ratios Bcl2+/Bad+ sont calculé. Les résultats sont exprimés en pourcentage des cellules positives ± SEM.

## 11. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. La signification statistique est calculée avec le test Mann-Whitney, et le  $p < 0.05$  est considéré comme significatif.

## **CHAPITRE IV : MANUSCRIT I**

**« ENDOTHELIN-1 PROMOTES OSTEOARTHRITIC CARTILAGE  
DEGRADATION VIA MMP-1 AND MMP-13 INDUCTION »**

***Marjolaine Roy-Beaudry, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Jean-Pierre Pelletier,  
MD, Khatija Nait M'Barek, MSc, Stephan Christgau, PhD\*, Fazool Shipkolye,  
MSc and Florina Moldovan, MD, PhD***

***Arthritis & Rheumatism, 48(10):2855-2864***

**B) Permission de l'éditeur d'une revue**

Nom de la revue : Arthritis & Rheumatism  
2200 W. Main Street, suite B210  
Durham, NC  
27705

Nom de l'éditeur : David S. Pisetsky, M.D., Ph.D.

Identification de l'article : *Marjolaine Roy-Beaudry, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Jean-Pierre Pelletier, MD, Khatija Nait M'Barek, MSc, Stephan Christgau, PhD, Fazool Shipholye, MSc, and Florina Moldovan, MD. Endothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via MMP-1 and MMP-13 induction* 48 (10): 2855-2864, 2003.

Marjolaine Roy-Beaudry est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : « L'effet de l'endothéline-1 sur le système MMP/TIMP dans les chondrocytes arthrosiques. »

David Pisetsky                      Dusty                      11/7/04  
Editor's name                      Signature                      Date

## ACCORD DES COAUTEURS

Marjolaine Roy-Beaudry  
2-484-1-0 M.Sc. Sc. Biomédicales

*Marjolaine Roy-Beaudry, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Jean-Pierre Pelletier, MD, Khatija Nait M'Barek, MSc, Stephan Christgau, PhD, Fazool Shipkolye, PhD and Florina Moldovan, MD*

### **Endothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via MMP-1 and MMP-13 induction**

Arthritis and Rheumatism  
2003, 48 (10): 2855-2864.

#### A) Déclaration des coauteurs d'un article

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marjolaine Roy-Beaudry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : L'effet de l'endothéline-1 sur le système MMP/TIMP dans les chondrocytes arthrosiques.

*Johanne Martel-Pelletier* 17/12/03  
\_\_\_\_\_  
Johanne Martel-Pelletier, Coauteur Signature Date

*J.P. Pelletier* 16/12/03  
\_\_\_\_\_  
Jean-Pierre Pelletier, Coauteur Signature Date

*Khatija Nait M'Barek* 23 Decembre 2003  
\_\_\_\_\_  
Khatija Nait M'Barek, Coauteur Signature Date

\_\_\_\_\_  
Stephan Christgau, Coauteur Signature Date

*Fazool Shipkolye* 17/12/03  
\_\_\_\_\_  
Fazool Shipkolye, Coauteur Signature Date

*Florina Moldovan* 18.12.2003  
\_\_\_\_\_  
Florina Moldovan, Coauteur Signature Date

## CONTRIBUTION À L'ARTICLE

Ma contribution a consisté : 1) dans la réalisation de plusieurs manipulations et expériences nécessaires pour arriver aux conclusions incluses dans l'article : culture des chondrocytes, j'ai réalisé les stimulations et la mise au point des conditions expérimentales, dosage ELISA et mesures de l'activité enzymatique des collagénases, 2) dans la réalisations des figures représentatives des résultats obtenus incluant la photo de l'immunohistochimie incluse dans le travail, 3) dans la rédaction de l'article surtout pour la description de la méthodologie et le développement de la discussion.

Dr Jean-Pelletier et Dr Johanne-Martel Pelletier sont les directeurs de l'Unité de recherche en Arthrose et ont contribué en apportant leur expertise acquise pendant plusieurs années dans le domaine de l'arthrose humaine. Ils ont approvisionné notre laboratoire avec des tissus humains étant donnée qu'ils ont une collaboration établie depuis de nombreuses années avec les différents hôpitaux de Montréal. Leurs commentaires et critiques scientifiques ont significativement amélioré la qualité du travail. Les sondes utilisées, les cellules et les infrastructures utilisées dans ce travail ont été fournies par leur laboratoire.

Khatija Nait M'Barek : a réalisée les immunohistochimies incluses dans cet article.

Fazool Shipkolye : a contribué au niveau technique (mises au point et réalisation des RT-PCR et Northern blots) et rédaction (contribution à la rédaction de l'article et la révision de la langue anglaise)

Dr Stephen Christgau a généreusement effectué l'analyse de fragments de collagène de type II et a développé les anticorps reconnaissant les anti néoépitopes du fragment de collagène de type II.


Dr Florina Moldovan: le travail a été réalisé sous la direction du Dr Moldovan à partir de la conception du travail, l'acquisition des résultats, l'analyse et l'interprétation des données jusqu'à la préparation du manuscrit et sa publication. Le travail a été soutenu financièrement par la subvention de recherche accordée par les IRSC au Dr Moldovan.

**ENDOTHELIN-1 PROMOTES OSTEOARTHRITIC CARTILAGE DEGRADATION  
VIA MMP-1 AND MMP-13 INDUCTION**

**Marjolaine Roy-Beaudry, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Jean-Pierre Pelletier,  
MD, Khatija Nait M'Barek, MSc, Stephan Christgau, PhD\*, Fazool Shipkolye,  
MSc and Florina Moldovan, MD, PhD**

Osteoarthritis Research Unit, Hôpital Notre-Dame, Centre Hospitalier de  
l'Université de Montréal, and Department of Medicine, University of Montreal  
Montreal, Quebec, Canada, \*Nordic Bioscience A/S, Herlev, Denmark

**Grant Support:** This work was supported by grants from the Canadian Institutes of  
Health Research (CIHR) (DSH-44200 and MOP-57760).

**Address correspondence and Requests for Reprints to:** Florina Moldovan, MD,  
PhD, Assistant Professor, Osteoarthritis Research Unit, Hôpital Notre-Dame,  
Centre hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 Sherbrooke Street East,  
Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1. Telephone: (514) 890-8000, ext. 25119,  
Fax: (514) 412-7583. 

## ABSTRACT

**Objective:** Degradation of the collagenous extracellular matrix by metalloproteases (MMPs) plays an important role in the pathogenesis of osteoarthritis (OA). Recently, it was suggested that endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor, may be involved in MMP regulation. This study investigated the role of ET-1 in OA cartilage degradation.

**Methods:** We explored ET-1 expression and synthesis in normal and OA cartilage and synovial membrane by RT-PCR and immunohistochemistry. MMP-1 and MMP-13 gene expression and protein synthesis were investigated using Northern Blot and ELISA immuno-assays. Additionally, ET-1-induced collagenase activity, collagen type II metabolites, and TIMP-1 protein were investigated.

**Results:** Firstly, we showed expression and synthesis of ET-1, *in situ*, in both normal and OA cartilage and synovial membrane. We demonstrated that ET-1 induced both MMP-1 and MMP-13 gene expression and protein synthesis. In culture, OA chondrocytes produced these enzymes, and the production increased in a dose-dependent manner in the presence of ET-1. In OA cartilage, ET-1 also induced collagen type II derived neo-epitopes concomitantly with an increased collagenase activity and a decrease in TIMP-1 protein.

**Conclusion:** Our results provide strong evidence of the catabolic role for ET-1 in OA cartilage via MMP-1 and MMP-13 upregulation. As well, ET-1 increased the net MMP/TIMP balance and secondarily increases collagen degradation. Hence, ET-1 becomes an attractive factor to target in the conception of new therapeutic approaches for OA and other diseases wherein MMP-13 and MMP-1 action is crucial in tissue alteration.



## INTRODUCTION

Anatomically, osteoarthritis (OA) is characterized by a progressive destruction of articular cartilage, which is more pronounced in the weight bearing areas of the joints. In advanced cases, this results in the complete loss of cartilage tissue and in the formation of large ulcers with bone exposure. Disruption of the articular cartilage is a hallmark of the failure of chondrocytes to maintain a homeostatic balance between articular matrix synthesis and degradation (1, 2). Various factors are directly involved in this process; these include matrix metalloproteases (MMPs), cytokines, growth factors and nitric oxide (NO) production (2-5). Among these, MMPs appear to be the most important catabolic agents in articular cartilage.

Metalloproteases are a family of structurally related zinc-dependent neutral endopeptidases, classified into subgroups of collagenases, gelatinases, stromelysins, membrane-type MMPs and other MMPs (6). MMP-1 and MMP-13 are among the collagenases that were previously reported to play a key role in cartilage degradation in joint pathology (4, 7-10). These enzymes are capable of degrading type II collagen, which is the major structural protein of cartilage (4, 11). MMP-1 is specifically involved in tissue destruction during the inflammatory process, while MMP-13 has a role in the remodelling phase of the disease. MMP-13 preferentially cleaves type II collagen and is 5-10 times more active on this collagen type than MMP-1 (4, 12). Regulation of MMP-1 and MMP-13 expression and protein production involves several factors including cytokines and growth factors (4, 9).

During recent years, it has been suggested that endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor peptide (13), may also be involved in tissue remodelling by upregulating the production of MMPs (14-17). ET-1 belongs to a family of three structurally related peptides (ET-1, ET-2 and ET-3) originally found in vascular endothelial cells and known to induce contraction of smooth muscle cells (18). The ETs exert their biological activity through activation of at least two G-protein

coupled receptor types namely ETA and ETB (19, 20). Since its discovery, the pharmacological actions of exogenous ET-1 have been extensively analysed, but the role of endogenous ET-1 has long been obscure. The recent development of potent and selective ET-receptor antagonists has allowed more clarification of the role of ET-1 in vivo. Apart from its well known effect on smooth muscle cells, ET-1 appears to be also involved in chronic diseases characterized by intense extra-cellular matrix (ECM) destruction (21, 22). For instance, in ovarian carcinoma cells, ET-1 induces over-expression and activation of a panel of MMPs including MMP-13 (14). In scleroderma fibroblasts, MMP-1 was downregulated by ET-1 (15), and in myocardial infarction, it was shown that interaction between ET-1 and MMP leads to ECM destruction (17, 21). All the effects of ET-1 on MMP regulation were reported to be a consequence of the binding of ET-1 to the ETA receptor (14, 16, 17, 22) which has previously been shown to be the predominant receptor type in animal chondrocytes (23-25). Cultured rat articular chondrocytes constitutively produce ET-1, and this is upregulated by several factors such as cytokines, growth factors and the age of the animals (26, 27). ET-1 was also found in the synovial fluid and plasma of both OA and rheumatoid arthritis (RA) patients where its increased concentrations were correlated with the severity of the disease processes (28, 29). Additionally, the elevated endogenous levels of ET-1 in several tissues was associated with aging and age-related diseases such as hypertension, arteriosclerosis and joint pathology such as RA and OA (21, 28-30).

Based on these findings, we hypothesized that ET-1 was involved in OA cartilage destruction. In the present study, we reported the production of ET-1 in human normal and OA tissues (cartilage and synovial membrane) as well as its effects on MMP-1 and MMP-13 gene expression and protein production. In addition, we also investigated the ET-1-induced degradation of type II collagen.

## MATERIALS AND METHODS

**Specimen Selection.** Human cartilage from tibial plateaus and synovial membrane specimens were obtained from 12 OA patients ( $58 \pm 6$  years mean  $\pm$  SEM) undergoing total knee replacement and from 10 normal individuals ( $52 \pm 10$

years mean  $\pm$  SEM) at autopsy within 12 hours of death. All patients were evaluated by a certified rheumatologist based on the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA criteria (31). The Institutional Ethics Committee Board of Notre Dame Hospital approved the study protocol and the use of human tissues. Normal tissues were obtained from individuals with no history of joint disease, showing macroscopic and microscopic normal cartilage and synovial membrane. All specimens were evaluated using the Mankin histological/histochemical scale. Sections were stained with Safranin O and Fast green as previously described (32, 33). All OA specimens used were given Mankin scores of 3-7, which corresponds to a moderate degree of the severity of this disease.

**Cell culture and RNA extraction.** Cartilage and synovial membrane specimens were rinsed separately, dissected and cells released as previously described (4). Briefly, sequential enzymatic digestion was performed with 1 mg/ml pronase (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) for 1 hour, followed by 6 hours with 2 mg/ml collagenase (type IA; Sigma-Aldrich) at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco-BRL Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml penicillin (Gibco-BRL), and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco-BRL). After digestion,  $2 \times 10^6$  chondrocytes or synovial fibroblasts were plated in tissue culture flasks (25 cm<sup>2</sup>) and cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air until confluence. Twenty-four hours before the experiment, the cells were incubated in fresh serum-free medium, and only first passage culture cells were used. Total RNA was extracted from chondrocytes using Trizol reagent (Gibco-BRL) as previously described (4) and processed according to the manufacturer's specifications. The extracted RNA was quantitated by the Ribo-Green methodology (34).

**RT-PCR.** Human normal and OA chondrocytes and synoviocytes were cultured in 4-well cell plates (NUNC International, Napperville, USA) in DMEM and total RNA

was then extracted. For RT-PCR, 1  $\mu$ g of total RNA was used and the reverse transcription and polymerase chain reaction were carried out according to Lange et al, (35). The ET-1 primers used were as follows: 5' primer 5'-GTCAACACTCCCGACCACGTT-3' and 3' primer 5'-CTGGTTTGTCTTAGGTGTTCCCTC-3' and yielded an amplified product of 304 bp. The GAPDH primers used were as follows: 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' for the forward primer and 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3' for the reverse primer. The PCR reaction was carried out as for the ET-1 PCR. The GAPDH transcript is 319 bp long.

**Immunohistochemistry and morphometric analysis.** Cartilage (normal: n=10, OA: n=12) and synovial membrane (normal: n=8, OA: n=8) specimens were processed directly for immunohistochemistry as previously described (9, 36). Briefly, specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5  $\mu$ m) of paraffin-embedded specimens were de-paraffinized in toluene, hydrated in a degraded series of ethanol, and preincubated with chondroitinase ABC (0.25 U/ml in PBS; Sigma-Aldrich) for 60 minutes at 37°C. The tissue sections were incubated with 5  $\mu$ g/ml of monoclonal anti-ET-1 antibody (Research Diagnostic inc. Flanders, NJ) and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). The colour was developed by DAB (Dako Diagnostics Canada Inc; Mississauga, ON, Canada) containing hydrogen peroxide, and the slides were counterstained with nuclear fast red stain (Digene Diagnostics Inc., Silver Spring, MD). The specificity of staining was evaluated by 3 controls i) absorbed immune serum (1 hour, 37°C) with a 10-fold molar excess of recombinant ET-1 peptide (Sigma-Aldrich), ii) omission of the primary antibody; and iii) substitution of the primary antibody with non-immune IgG (Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands) following the same experimental protocol. The evaluation of the positively staining chondrocytes was performed using our previously published methods (9, 36). For each specimen, 6 microscopic fields were examined (X40; Leitz Diaplan, Wetzlar, Germany): 3 fields at the superficial and upper intermediate layers (superficial zone) and 3 fields at the lower intermediate and deep layers (deep zone). The total number of chondrocytes and

the number of chondrocytes staining positive for ET-1 were evaluated separately for each zone of cartilage and for the full-thickness cartilage (superficial and deep zones). Each slide was subjected to a double-blind evaluation with a maximum variation of 5% recorded. Results were expressed by the percentage of chondrocytes staining positive for ET-1 (cell score), the maximum score being 100%.

**Determination of type II collagen fragments.** Experiments were conducted with OA cartilage explants incubated in presence or absence of human recombinant ET-1 (10 nM, Sigma-Aldrich) for 7 days. At the end of the incubation period, media and explants were collected and collagen type II fragments determined. Each cartilage explant was divided into two parts: the first part was used for protein extraction and the second one fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin for immunohistochemistry. For protein extraction, cartilage was weighed, sliced and homogenized in a buffer consisting of 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05%Brij 35, and 2M guanidine hydrochloride, pH 7.5. The homogenate was incubated overnight at 4°C with gentle shaking. After centrifugation at 3000 g for 10 minutes, extracts were dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 7.5 with three buffer changes. The collagen type II fragments were quantified in the cartilage extracts and conditioned media (n=3) by a specific ELISA immuno-assay (CartiLaps, Nordic Bioscience A/S, Herlev, Denmark) (37). In brief, this assay consisted of a monoclonal antibody recognising a linear 6 amino acid epitope from the middle region of the collagen type II C-telopeptide used in a competitive ELISA format. The same monoclonal anti-collagen type II fragment antibodies were used for immunohistochemistry (n=6) detection (2 µg/ml), which was performed using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). The results are expressed as the mean ± SEM (for Cartilaps immuno-assay) and as representative tissue sections (for immunohistochemistry).

**Northern Blotting.** OA chondrocytes were cultured in 4-well cell plates in the presence or absence of ET-1 (10 nM) and interleukin-1β (IL-1β)(10 pg/ml) (positive control), and after RNA extraction, 5 µg of total RNA were resolved on 1.2%

formaldehyde-agarose gel and transferred electrophoretically to nylon membranes (Hybond-N; Amersham, Oakville, ON, Canada) in a 10 mM sodium acetate buffer (pH 7.8) containing 20 mM Tris and 0.5 mM EDTA overnight at 4°C. The RNA was cross-linked to the membrane by exposure to ultraviolet light. After prehybridization for 24 hours, hybridization was carried out at 68°C with MMP-1 and MMP-13 RNA probes. The MMP-1 probe was prepared from human MMP-1 full-length cDNA, generously provided by Dr. Dylan R. Edwards (University of Calgary, AB, Canada). The MMP-13 probe used consisted of the total coding sequence of the gene (1.4 kb), as well as 490 bp of the 3'-untranslated region, cloned into the pGEM-T vector (4). The RNA probes were transcribed and labeled with digoxigenin-11-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (DIG-11-UTP) (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada) according to the manufacturer's specification. Detection was carried out by chemiluminescence with CDP\* substrate (Roche Diagnostic) and revealed by exposure to Kodak X-AR5 film (Eastman Kodak, Rochester NY). After the first hybridization, the membrane was stripped and rehybridized with a digoxigenin-labeled probe specific to glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) RNA which served as a housekeeping gene. The autoradiographs were scanned with the Chemilmager 4000 (Alpha Innotech, San Leandro, CA) imaging system, and the GAPDH mRNA levels were calculated as the relative expression of the probe to mRNA. Data were calculated as a ratio of MMP13 or MMP-1 over GAPDH for each stimulation for 3 independent specimens.

**MMP-1, MMP-13 and TIMP-1 ELISA assays.** OA chondrocytes (n=5) were cultured in 24-well plates in presence or absence of ET-1 (0-100 nM). Following incubation, the conditioned culture medium was collected and MMP-1 and MMP-13 protein levels determined using a specific ELISA assay. The ELISA assay (Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, England) for MMP-1 specifically detected the total human MMP-1, i.e. active MMP-1, the proform of the protein and the complexed form with inhibitors such as TIMP-1. The sensitivity of this assay was 1.7 ng/ml, and there was no significant cross-reactivity or interference in the assay with MMP-3, MMP-2 and MMP-9. The MMP-13 ELISA assay (Amersham Pharmacia Biotech) was a monoclonal polyclonal based assay

that was specific for both proform and active MMP-13. The TIMP-1 ELISA assay (Amersham Pharmacia Biotech) recognised total human TIMP-1 (i.e. free and complexed with MMPs), and the sensitivity of this assay was 1.25 ng/ml. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5 independent specimens.

**Determination of collagenase activity.** The collagenase activity was measured in the culture media from OA chondrocyte cultured with or without ET-1 (10 n M) for 24 hours. The collagenase activity was determined using FITC-labeled teloptide-free soluble bovine type II collagen as a substrate (Chondrex, Redmond, WA) according to the manufacturer's instructions. One unit of collagenolytic activity was defined as the cleavage of 1  $\mu$ g of collagen per hour. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 8 independent experiments.

**Statistical Analysis.** The data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was assessed by Mann-Whitney U-test and  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

**Expression and synthesis of ET-1 in human cartilage and synovial membrane.** The presence of ET-1 was demonstrated in both normal and OA human cartilage and synovial membrane. In cartilage, all the specimens (normal,  $n=10$ ; OA,  $n=12$ ) showed specific immunoreactivity for ET-1. However, in normal cartilage, ET-1 was only found in a few cells ( $14.6 \pm 2.5\%$ ) and exclusively at the superficial zone (Figure 1a). In OA cartilage, specific positive immunoreactivity for ET-1 was observed in chondrocytes from both the superficial and deep zones ( $41.1 \pm 8.3\%$ ) (Figure 1b). The statistical evaluation of the cell score for ET-1 indicated significant differences between N and OA cartilage in both the superficial and deep zone ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.03$ ) (Figure 1d).

In normal synovial membrane ( $n = 8$ ), ET-1 was found only in the endothelial cells of blood vessels. In contrast, in OA synovial membrane ( $n = 8$ ), specific staining was noted in the blood vessel cells and also in the lining layer (Figure 2b). Two of these specimens presented a mononuclear cell infiltrate that revealed positive immunoreactivity toward ET-1 (data not shown). Using RT-PCR, specific mRNA

coding for ET-1 was found in both normal and OA chondrocytes (Figure 1e) and in the normal and OA synoviocytes (Figure 2c).

**Effect of ET-1 on collagenase-generated collagen type II neoepitopes.** Figure 3 shows the effect of ET-1 on the release of type II collagen fragments (markers of cartilage degradation) from OA cartilage explants as well as the presence of these MMP generated fragments within the cartilage matrix (Figure 3). Using a specific immunoassay measuring a C telopeptide fragment of type II collagen, it was found that cleaved collagen fragments are present in the extracts from OA cartilage and that their concentration is significantly increased in the presence of IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ) or ET-1 ( $p < 0.009$ ) when compared to the non-stimulated OA cartilage. Interestingly, the concentration of the collagen fragments remained low in the culture media of the OA cartilage, even following incubation with IL-1 $\beta$  or ET-1 (Figure 3a). Localization of these neoepitopes was performed by immunohistochemistry employing the same collagen type II C-telopeptide specific monoclonal antibody as in the immunoassay. In OA cartilage cultured in the presence of ET-1 (10 nM) for 7 days (without shaking), specific intense staining was observed in the superficial and upper intermediate layers (superficial zone) (Figure 3c) as compared to weak staining in cartilage incubated in the absence of ET-1 for the same period (Figure 3b).

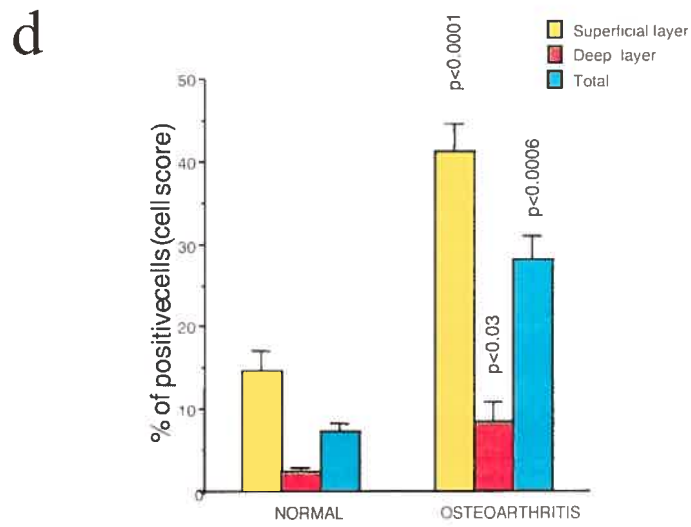
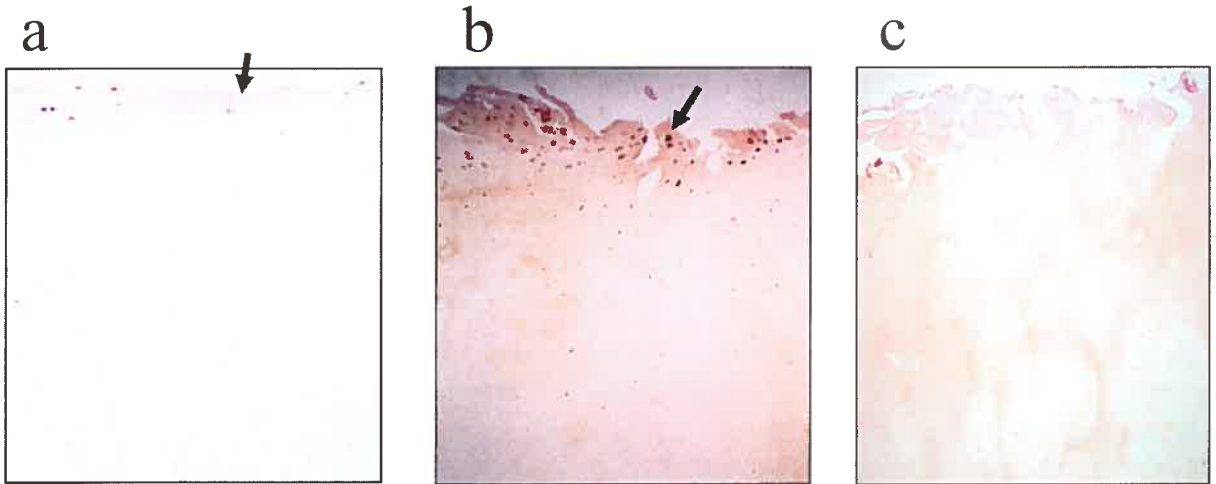
**Effect of ET-1 on MMP-1 and MMP-13 synthesis and activity.** MMP-1 and MMP-13 are the major enzymes involved in the degradation of cartilage collagen during OA process. To assess the importance of ET-1 in the induction of these enzymes, we analysed their expression in OA chondrocytes at the mRNA and protein levels. As illustrated in Figure 4, the mRNA transcripts for MMP-13 and MMP-1 were detected in non-stimulated OA chondrocytes. In the presence of ET-1, these levels increased 3.2 and 1.8-fold, respectively. For MMP-13, the two bands observed (3.0 and 2.5 kb) were the MMP-13 mRNA transcripts derived from the same gene (4). The effect of ET-1 on the synthesis of MMP-1 and MMP-13 by OA chondrocytes and on collagenase activity is shown in Figure 5. In culture, OA



chondrocytes produced significant amounts of these enzymes, and the production increased in a dose-dependent manner in the presence of ET-1 (n=5), (Figure 5a). Also 3-4 fold increases in total collagenase activity were seen in the culture media of OA chondrocytes in the presence of 10 nM of ET-1 ( $p < 0.05$ , n=8) (Figure 5b). The effect of ET-1 on TIMP-1 protein is shown in Figure 5c (n=5): a significant decrease ( $p < 0.02$ ) of total TIMP-1 was noted in the culture media of chondrocytes treated with 10 nM of ET-1.

**Figure 1. Immunohistochemical detection of ET-1 and the expression of the specific mRNA in human cartilage from normal and OA subjects.** **a:** normal cartilage shows only a few cells stained specifically for ET-1, and these were located mainly in the superficial layer. **b:** OA cartilage shows an intense immunoreactivity (brown staining) in the chondrocytes from the superficial and deep zones. **c:** OA specimen treated with anti-ET-1 antibodies adsorbed with a 10-fold equivalent mass of ET-1 (control of the staining specificity). No staining was observed. Original magnification X200. **d:** Histogram of the cell score for ET-1-positive chondrocytes in normal and OA specimens indicate significant differences between the OA and normal cartilage and between the superficial and deep zones for each cartilage type. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM for 10 normal and 12 OA specimens. Statistical analysis by the Mann Whitney U test indicates significant differences between normal and OA cartilage: superficial N versus superficial OA,  $p < 0.001$ ; deep N versus deep OA  $p < 0.03$ ; total N versus total OA  $p < 0.0006$ . **e:** RT-PCR for ET-1 gene expression from first passage normal and OA chondrocytes. ET-1-specific mRNA transcripts were present in normal ( $n = 4$ ) and OA specimens ( $n = 6$ ).

Figure 1

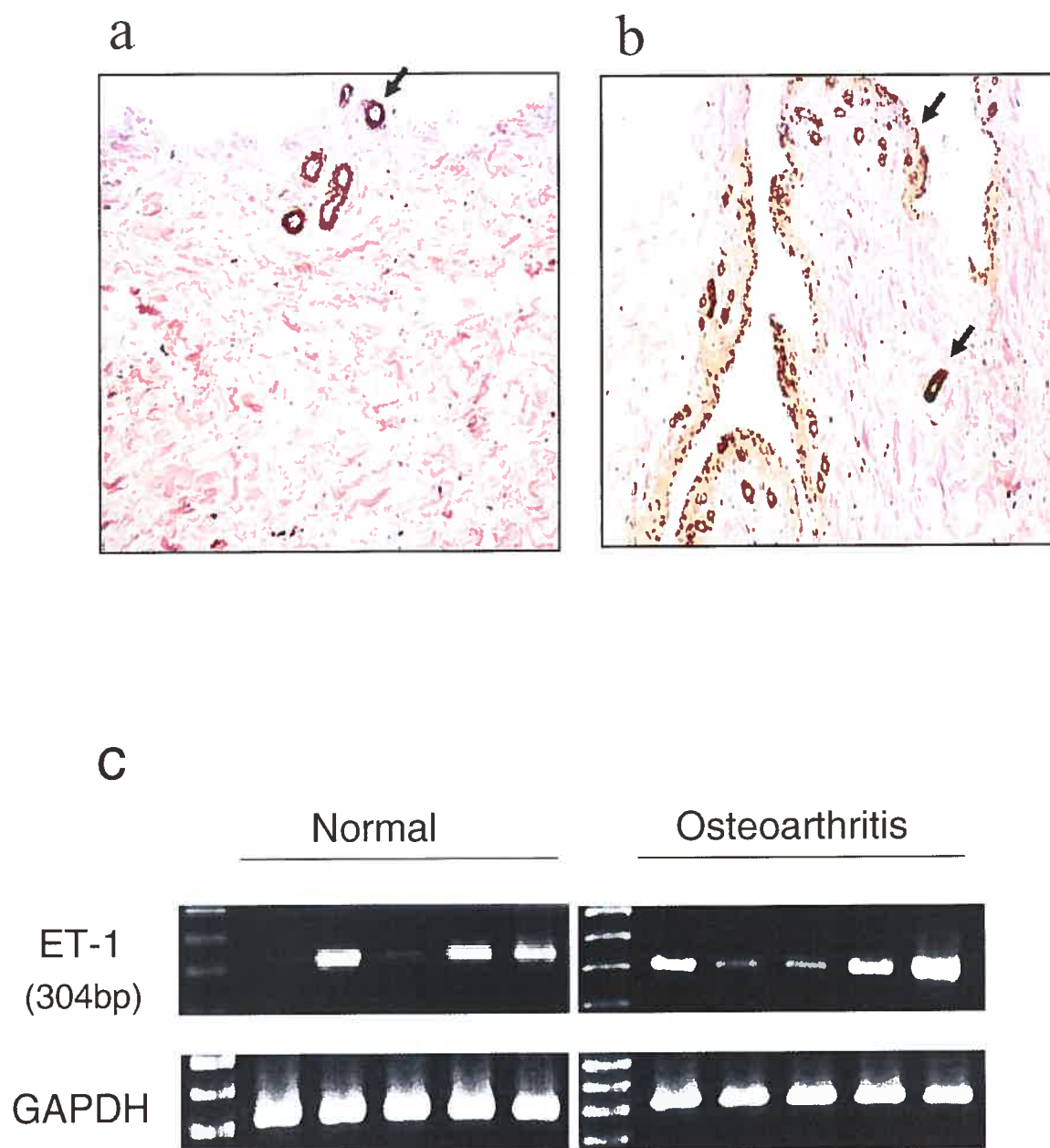


e  
Normal    Osteoarthritis



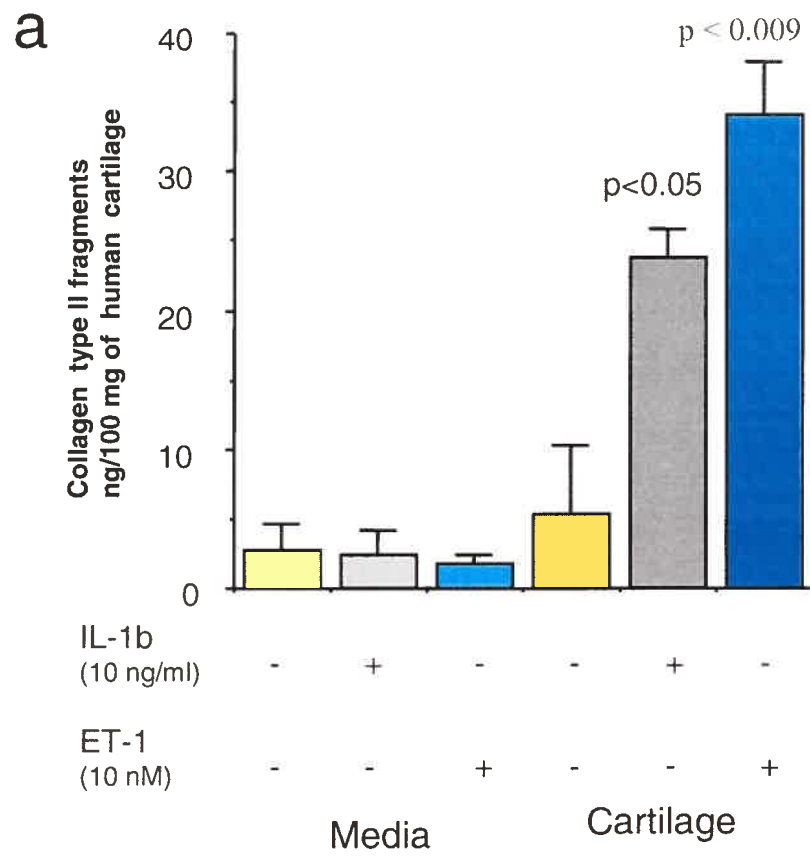
**Figure 2. Immunohistochemical detection of ET-1 in human normal (n=8) and OA synovial membrane (n=8).** **a:** An intense immuno-reactivity in the blood vessel walls of normal synovial membrane was observed. **b:** In OA synovial membrane, intense immuno-reactivity toward ET-1 was found in the blood vessel walls and in the synovial lining cells. Arrows show the staining (Original magnification X200). **c:** RT-PCR for ET-1 from normal (n= 5) and OA (n= 5) synoviocytes. ET-1 specific mRNA transcripts were detected in all the specimens.

Figure 2



**Figure 3. Effect of ET-1 on collagenase-generated neo-epitopes of type II collagen.** **a:** Specific quantification of the collagenase-generated neo-epitopes of type II collagen by CartiLaps immunoassay. OA cartilage explants were incubated for 7 days with or without ET-1 (10 nM) or IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). In the non-stimulated cartilage, the levels measured in the matrix of OA cartilage (CartiLaps) are 2-3 fold higher as compared to those measured in culture media. Following incubation with ET-1 or IL-1 $\beta$ , the measured levels drastically increased in the cartilage extracts but not in the culture media. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM for 3 independent specimens. In cartilage extracts, statistical analysis by the Mann Whitney U test indicate significant differences between IL-1 $\beta$  stimulated tissue versus non-stimulated tissue  $p < 0.05$ ; ET-1 stimulated tissue versus non stimulated tissue  $p < 0.009$ . **b** and **c:** Representative immunostaining of human OA cartilage specimens ( $n=6$ ) of collagenase- generated neo epitopes of type II collagen. OA cartilage incubated in absence (**b**) or presence (**c**) of ET-1 (10 nM) for 7 days. Intense immunoreactivity was observed in chondrocytes, extracellular and inter-territorial extracellular matrix (in the superficial and upper intermediate layers ) of OA cartilage cultured in the presence of 10 nM of ET-1. Original magnification X200.

Figure 3



**b**



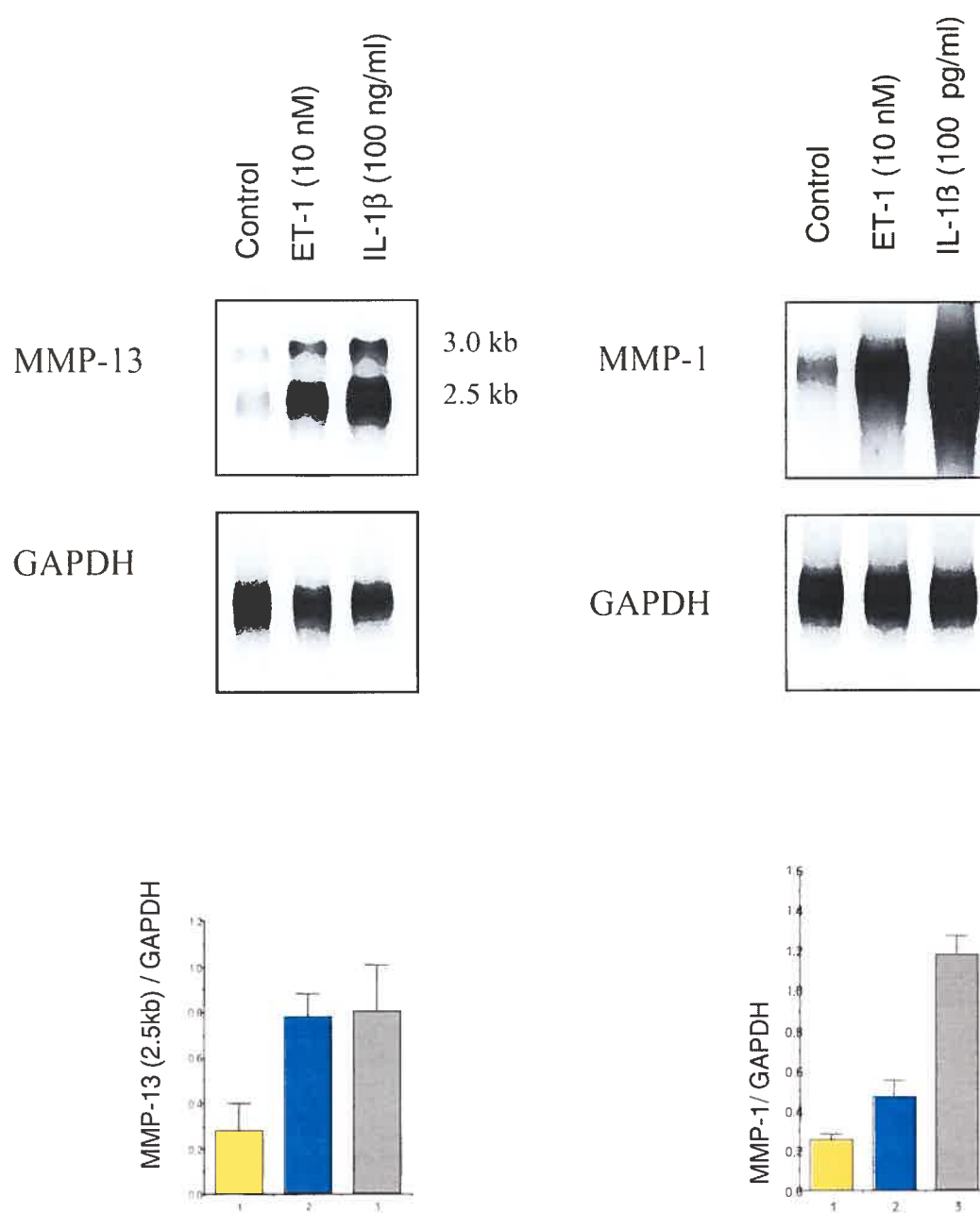
**c**



**Figure 4.** Representative Northern blot of MMP-1, MMP-13 and GAPDH mRNA of human OA chondrocytes in primary culture. Chondrocytes were incubated for 24 hours at 37°C in the presence or absence of ET-1 (10 n M) or IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Total RNA (5  $\mu$ g/lane) was analysed. The relative expression of mRNA was indicated by ratio of the band densities of MMP-1/GAPDH and MMP-13/GAPDH. A representative result of three different specimens is shown.

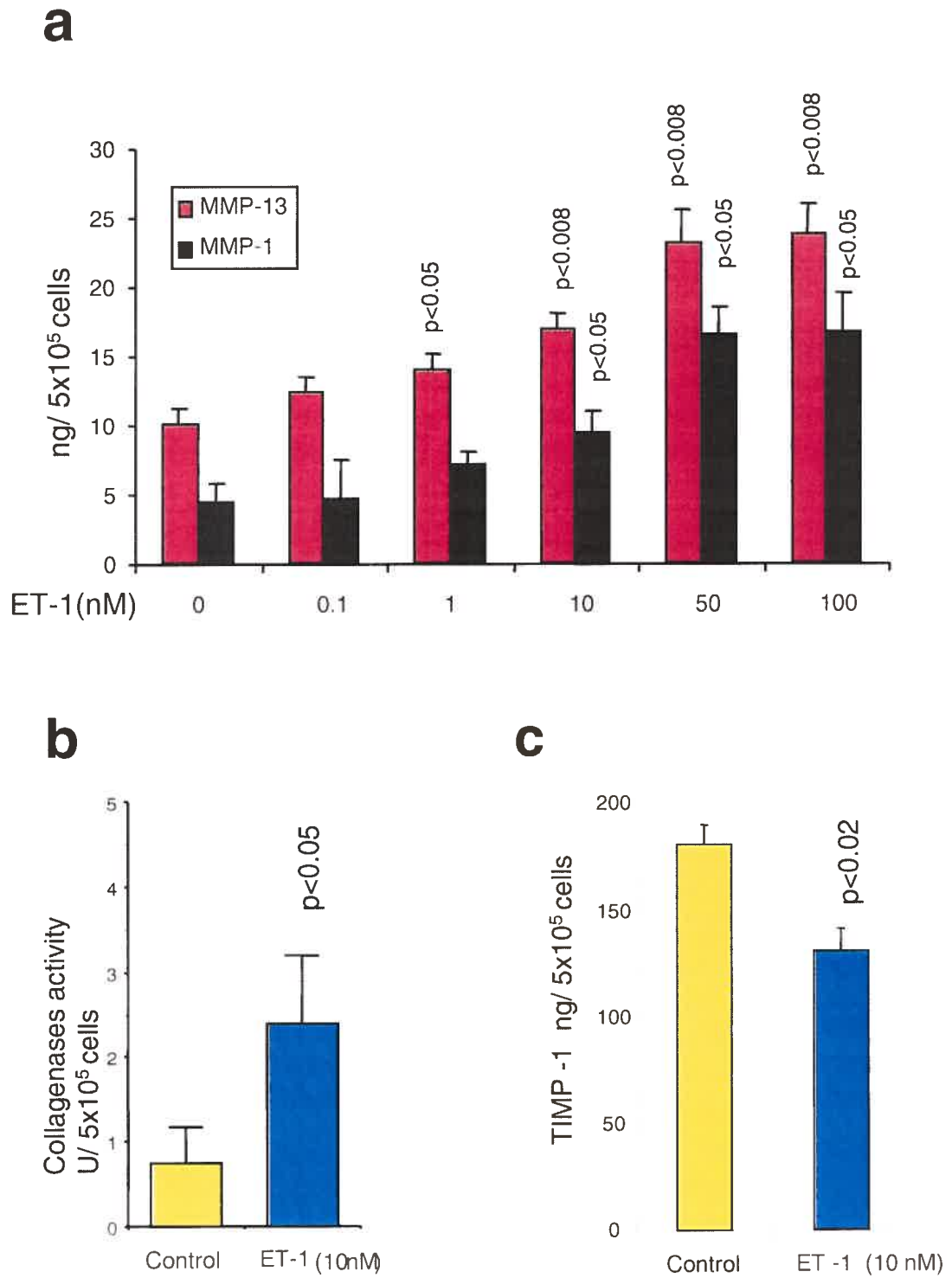


Figure 4



**Figure 5. a: Dose response of ET-1 induced MMP-1 and MMP-13 in OA chondrocytes.** Cells were treated with different concentrations of ET-1 (0-100 nM) for 24 hours. Conditioned media were assayed in duplicate and the results are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5 independent specimens. Statistical analysis by the Mann Whitney U test, indicates a difference between the stimulated and non-stimulated specimens (for both MMP-1 and MMP-13) **b: Collagenase activity detected in conditioned media of OA chondrocytes** cultured for 24 hours without ET-1 (control) or with ET-1 (10 nM). Detection was assayed in duplicate and the results are expressed as mean  $\pm$  SEM for 8 independent specimens. Statistical analysis by the Mann Whitney U test indicates significant differences between ET-1 stimulated cells and non-stimulated cells ( $p < 0.05$ ). **c: TIMP-1 quantification** in the culture media of OA chondrocytes cultured without ET-1 (control) or with ET-1 (10 nM). Assays were made in duplicate and the results are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5 independent specimens. Statistical analysis by the Mann Whitney U test indicates significant differences between ET-1 stimulated and non-stimulated cells.

Figure 5



## DISCUSSION

This study is the first to demonstrate expression and synthesis of ET-1 in both human cartilage and synovial membrane with an upregulation in OA tissues. In articular cartilage, ET-1 was preferentially found in the superficial zone, whereas in synovial tissue, it was present in the subintimal blood vessels and in the intimal lining cells. Both the expression and synthesis of ET-1 were much more intense in OA tissues as compared to normal ones. In addition, we showed that ET-1 upregulated the expression and synthesis of MMP-1 and MMP-13 by OA chondrocytes and that ET-1 increased the amount of active collagenases and collagen breakdown. As a whole, these results support a role for ET-1 as a new catabolic agent involved in articular cartilage destruction in OA pathology.

Local production of ET-1 in the human synovial membrane was previously reported by Miyasaka *et al*, (30), who observed an ET-like immunoreactivity that was many times higher in synovial fluids than in plasma. It was also shown that ET-1 could be detected in macrophage-like type A cells in cultured synovial fluids from RA patients (29, 38). Here we confirm these findings and, in addition, showed that ET-1 was also produced by articular chondrocytes. Thus, ET-1 produced locally in the synovium and, as shown here, by chondrocytes from superficial layers of articular OA cartilage, acts as a putative catabolic factor in the OA process and as an autocrine/paracrine regulator on the degradative enzymes of chondrocytes.

In OA pathology, the destructive process begins in the superficial zone of articular cartilage and then spreads toward the subchondral bone leaving behind fibrillation and ulcers. It is commonly believed that cartilage matrix, primarily proteoglycans and type II collagen are structurally modified by specific action of members of the tissue metalloprotease family (2). MMP-1 and MMP-13 are two collagenolytic enzymes demonstrated to play a major role in collagen alteration (4, 7, 8, 12). Until now, it was believed that the pro-inflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$ , were the principal agents that upregulated the synthesis and activity of the collagenolytic enzymes (4). Our results strongly support a role for ET-1 as a potent catabolic

factor in OA cartilage and presumably other tissues and diseases characterized by MMP-induced extracellular matrix alterations.

In cartilage matrix, degradation of type II collagen, a key component involved in the biomechanical function of articular cartilage, is responsible for irreversible changes in tissue structure leading to loss of cartilage and formation of specific collagen type II fragments, which are specific markers of joint diseases found in the synovial fluids of OA patients (37). These fragments are produced by proteolytic cleavage enzymes, which include MMP-1 and MMP-13 (4, 12). As shown in this study, ET-1 increased the production of these fragments within the tissue. However, their concentration remained low in the culture media in which OA cartilage was incubated and exposed to ET-1 or IL-1 $\beta$  (Figure 3a). This could be explained by a very slow rate of diffusion of the fragments through cartilage matrix either because they are large enough to be retained in the matrix or because of the absence of shaking. It is well known that in *ex vivo* experiments, cartilage incubated and exposed to collagenase without shaking is difficult to destroy especially during a relatively short period of time (7 days). In disease mechanical factors no doubt accelerates a loss of matrix components by disrupting collagen fibrillar network thus favoring diffusion of cleaved fragments and loss of matrix components. ET-1-induced collagen II fragmentation appears to be an early event resulting from an overproduction and increased activity of MMP-1 and MMP-13 enzymes.

To date, no study has been done on the effect of ET-1 on proteoglycan metabolism, alterations of proteoglycan structure and release. However, as we previously showed in Khatib et al. (39), ET-1 down-regulated proteoglycan biosynthesis in ageing animal chondrocytes. Because significant architectural changes have been observed in the structure of the proteoglycans as a result of ageing, and because ET-1 and ET-1 receptors have been up-regulated in chondrocytes from ageing animal (25, 40), characterization of these effects would be an interesting area of future investigation. Also, it is known that proteoglycans are progressively depleted, while chondrocytes appear to be unable to fully compensate for this depletion, resulting in a net loss of matrix. Thus, ET-1 could

affect proteoglycan turnover, as it destabilises homeostatic control between newly synthesized and catabolized proteoglycans.

This study was specifically designed to determine the effect of ET-1 on the collagenous component of the OA cartilage. Here, we clearly demonstrate that ET-1 acts through the two most important collagenolytic enzymes (MMP-1 and MMP-13) in OA pathology. However, ET-1 could also regulate other factors involved in the physiological homeostasis of the MMP activation. Thus, specific tissue inhibitors of metalloproteases (TIMPs) (2, 41, 42) are likely candidates for ET-1 action, as our study revealed an ET-1- induced reduction for TIMP-1. This supports a role of ET-1 in the regulation of the net balance between MMP and TIMP in OA chondrocytes. It is well known that in OA cartilage, there is an imbalance between the amount of TIMP and metalloprotease activity, which is due to a relative deficiency of these tissue inhibitors (TIMPs) (2, 42). It is noteworthy that in ovarian carcinoma cell lines, ET-1 decreases TIMP-1 and TIMP-2 production (14), thus driving the cell metabolism exclusively toward tissue destruction.

This study was not designed to investigate the putative synergy between ET-1 and IL-1 $\beta$ . However, preliminary data suggest that such synergy exists and would result from a very complex molecular interaction, because on one hand ET-1 induces both the IL-1 $\beta$  and ET-1 genes at the transcriptional level and, that IL-1 $\beta$  has a positive feedback on ET-1 synthesis(27, 40). Furthermore, by inducing synthesis of gelatinases, IL-1 $\beta$  could trigger the production of other active forms of ET-1. One of these could be the newly discovered ET-1 (1-32) resulting from MMP-2 and MMP-9 cleavage (43). Additional studies are needed to clarify the direct or indirect relationship between ET-1 and IL-1 $\beta$ , as well as their potential to act synergistically in term of cartilage degradation.

In conclusion, our results demonstrate new evidence for the catabolic role of ET-1 in OA pathophysiology. Again, it is clear that OA is a very complex process involving changes in the cartilage destruction associated with a loss of collagen. The pathogenesis of OA is due to altered chondrocyte phenotype/metabolism

mediated by several signals leading to the synthesis of mediators of synovial inflammation and cartilage deterioration that alter the matrix. Thus, in OA, we could attribute to ET-1 a pathophysiological function as an autocrine/paracrine factor. ET-1 acts by increasing the production of certain collagenolytic MMPs and decreasing that of TIMPs, as well as that of matrix macromolecules, thus driving cell metabolism toward uncompensated matrix destruction. In addition, our results show that ET-1 could be considered as part of the list of factors playing a critical role in the regulation of MMPs. Hence, this peptide becomes an attractive factor to target in the development of new approaches for therapeutic treatment of OA and possibly other diseases where MMP action is a crucial event in tissue degradation.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Dragoslav R. Mitrovic for his invaluable collaboration, critical reading and discussion of this manuscript, Nordic Bioscience for the collagen type II reagents, and Heather Yampolsky for her assistance in manuscript preparation.



## REFERENCES

1. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: WJ Koopman, editors. *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. Baltimore, Williams & Wilkins; 2001, p. 2195-2245.
2. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr.: Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989;84: 678-685.
3. Martel-Pelletier J, Alaaeddine N, Pelletier JP: Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 1999;4: D694-703.
4. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996;97: 2011-2019.
5. Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP: The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 2000;165: 3402-3410.
6. Nagase H, Woessner JF Jr: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274: 21491-21494.
7. Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier J.P. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. In: AD Woolf, editors. *Baillière's Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. East Sussex, United Kingdom, Baillière Tindall; 2002,
8. Cawston T: Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today* 1998;4: 130-137.
9. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage *in situ*: *In vitro* mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 1997;40: 1653-1661.
10. Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T: Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes *in vivo* and *in vitro*. *Arthritis Rheum* 2002;46: 2648-2657.
11. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, *et al*: Enhanced cleavage of Type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997;99: 1534-1545.
12. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, *et al*: Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix

- metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996;97: 761-768.
13. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, *et al.*: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332: 411-415.
  14. Rosano L, Varmi M, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, *et al.*: Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61: 8340-8346.
  15. Xu S, Denton CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM: Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31 Suppl 1: S360-363.
  16. Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y, Koide H: Effect of a specific endothelin A receptor antagonist on murine lupus nephritis. *Kidney Int* 1995;47:481-489.
  17. Podesser BK, Siwik DA, Eberli FR, Sam F, Ngoy S, Lambert J, *et al.*: ET(A)-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280: H984-991.
  18. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, *et al.*: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86: 2863-2867.
  19. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990;348: 730-732.
  20. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, *et al.*: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348: 732-735.
  21. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, *et al.*: Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med* 2002;80: 105-116.
  22. Kim NH, Rubin LJ: Endothelin in health and disease: endothelin receptor antagonists in the management of pulmonary artery hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2002;7: 9-19.
  23. Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Soliman H, Fiet J, Mitrovic DR: Endothelin 1 receptors, signal transduction and effects on DNA and proteoglycan synthesis in rat articular chondrocytes. *Cytokine* 1998;10: 669-679.
  24. De-Melo JD, Tonussi CR, D'Orleans-Juste P, Rae GA: Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously

- inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. *Pain* 1998;77: 261-269.
25. Messai H, Panasyuk A, Khatib A, Barbara A, Mitrovic DR: Endothelin-1 receptors on cultured rat articular chondrocytes: regulation by age, growth factors, and cytokines, and effect on cAMP production. *Mech Ageing Dev* 2001;122: 519-531.
  26. Khatib AM, Ribault D, Quintero M, Barbara A, Fiet J, Mitrovic DR: The mechanism of inhibition of endothelin-1-induced stimulation of DNA synthesis in rat articular chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1997;132: 25-31.
  27. Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Fiet J, Mitrovic DR: Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocyte culture. *Cytokine* 1997;9: 556-562.
  28. Nahir AM, Hoffman A, Lorber M, Keiser HR: Presence of immunoreactive endothelin in synovial fluid: analysis of 22 cases. *J Rheumatol* 1991;18: 678-680.
  29. Yoshida H, Imafuku Y, Ohhara M, Miyata M, Kasukawa R, Ohsumi K, *et al.*: Endothelin-1 production by human synoviocytes. *Ann Clin Biochem* 1998;35: 290-294.
  30. Miyasaka N, Hirata Y, Ando K, Sato K, Morita H, Shichiri M, *et al.*: Increased production of endothelin-1 in patients with inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1992;35: 397-400.
  31. Altman RD, Asch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, *et al.*: Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986;29: 1039-1049.
  32. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53: 523-537.
  33. Fernandes JC, Tardif G, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Dupuis M, Moldovan F, *et al.*: *In vivo* transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: Prevention of osteoarthritis progression. *Am J Pathol* 1999;154: 1159-1169.
  34. Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL: RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem* 1998;265: 368-374.
  35. Lange M, Pagotto U, Hopfner U, Ehrenreich H, Oeckler R, Sinowatz F, *et al.*: Endothelin expression in normal human anterior pituitaries and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79: 1864-1870.

36. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme/Caspase-1 in human osteoarthritic tissues: Localization and role in the maturation of IL-1 $\beta$  and IL-18. *Arthritis Rheum* 1999;42: 1577-1587.
37. Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, *et al.*: Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* 2001;29: 209-215.
38. Yoshida H, Ohhara M, Ohsumi K: Production of endothelin-1 by cultured human synoviocytes. *Clin Chim Acta* 1997;259: 187-189.
39. Khatib AM, Siegfried G, Messai H, Moldovan F, Mitrovic DR: Mechanism of inhibition of endothelin-1 stimulated proteoglycan and collagen synthesis in rat articular chondrocytes. *Cytokine* . 2002;17: 254-261.
40. Messai H, Khatib AM, Lebrun G, Aubin P, Florina M, Jean F, *et al.*: Endothelin-1 in monolayer cultures of articular chondrocytes from young and old rats: regulation by growth factors and cytokines. *Mech Ageing Dev* 2000;114: 37-48.
41. Zafarullah M, Su S, Martel-Pelletier J, DiBattista JA, Costello BG, Stetler-Stevenson WG, *et al.*: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes. *J Cell Biochem* 1996;60: 211-217.
42. Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP: Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994;70: 807-815.
43. Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG: Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]. *FASEB J* 2001;15: 2230-2240.

## **CHAPITRE V: MANUCRIT II**

**« ENDOTHELIN-1 IN OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES  
TRIGGERS NITRIC OXYDE PRODUCTION AND UP-REGULATES  
COLLAGENASE PRODUCTION »**

**Christina Alexandra Manacu, Johanne Martel-Pelletier, Marjolaine Roy-  
Beaudry, Jean-Pierre Pelletier, Julio C. Fernandes, Fazool S. Shipkolye,  
Dragoslav R. Mitrovic and Florina Moldovan**

**ACCORD DES COAUTEURS**

**Marjolaine Roy-Beaudry**  
2-484-1-0 M.Sc. Sc. Biomédicales

*Cristina Alexandra Manacu, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Marjolaine Roy-Beaudry, Jean-Pierre Pelletier, MD, Fazool Shipholye, PhD Dragoslav R. Mitrovic PhD and Florina Moldovan, MD*

**Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and up-regulates collagenase production**  
Arthritis and Rheumatism  
soumis

**A) Déclaration des coauteurs d'un article**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marjolaine Roy-Beaudry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : L'effet de l'endothéline-1 sur le système MMP/TIMP dans les chondrocytes arthrosiques.

17/12/03

17/12/03

22/12/03

18.12.2003

### ACCORD DES COAUTEURS

**Marjolaine Roy-Beaudry**  
2-484-1-0 M.Sc. Sc. Biomédicales

*Cristina Alexandra Manacu, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Marjolaine Roy-Beaudry, Jean-Pierre Pelletier, MD, Fazool Shipkolye, Julio Fernandes, MD, PhD Dragoslav R. Mitrovic PhD and Florina Moldovan, MD*

**Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and up-regulates collagenase production**  
Arthritis and Rheumatism  
soumis

#### A) Déclaration des coauteurs d'un article

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marjolaine Roy-Beaudry inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : L'effet de l'endothéline-1 sur le système MMP/TIMP dans les chondrocytes arthrosiques.

\_\_\_\_\_  
Cristina Alexandra Manacu, Auteur Signature Date

\_\_\_\_\_  
Johanne Martel-Pelletier, Coauteur Signature Date

\_\_\_\_\_  
Jean-Pierre Pelletier, Coauteur Signature Date

\_\_\_\_\_  
[Redacted] Signature Date

19/12/03

\_\_\_\_\_  
Julio Fernandes Coauteur Signature Date

\_\_\_\_\_  
[Redacted] Signature Date

19. 12. 2003

\_\_\_\_\_  
Florina Moldovan, Coauteur Signature Date

## CONTRIBUTION À L'ARTICLE

J'ai eu une contribution significative à la réalisation de cette recherche : J'ai effectué plusieurs manipulations et expériences en effectuant de la culture cellulaire des chondrocytes pour ainsi procéder aux différentes expériences et en particulier celles réalisées avec l'inhibiteur de la iNOS (L-NIL). J'ai effectué tous les Western blots inclus dans ce manuscrit. De plus, j'ai participé à la préparation des figures représentatives des résultats obtenus.

Cristina Alexandra Manacu (étudiante M.Sc.) a contribué à la réalisation des manipulations en effectuant les l'ELISA de la MMP-1 et la MMP-13, les mesures des protéines et du NO. Elle a réalisé les statistiques et les investigations de l'apoptose ainsi que les détections immunohistochimiques des protéines Bad et BCL2. Elle a contribué à la réalisation des photos de immunocytochimie et à la mise au point de la technique d'immunohistochimie. À contribué à la rédaction de l'article (partie méthodologie) et préparation de figures.

Dr Jean-Pelletier et Dr Johanne-Martel Pelletier sont les directeurs de l'Unité de recherche en Arthrose et ont contribué en apportant leur expertise en signalisation. Ils ont contribué à la discussion des résultats obtenus et à la critique de l'article. Certains des infrastructures utilisées dans ce travail ont été fournis par leur laboratoire.

Julio C. Fernandez a approvisionné notre laboratoire avec des tissus humains provenant des patients opérés dans le Service d'Orthopédie du CHUM, a expliqué et obtenu le consentement des ses patients et a collaboré à la discussion des résultats obtenus.

Fazool Shipkolye (Assistant de recherche) a participé à la réalisation de l'article en effectuant la préparation des cellules à partir des tissus de cartilage ainsi qu'en effectuant l'ELISA MMP-13. De plus, il a grandement participé à l'écriture, à la révision et à la correction de la version anglaise.

Dragoslav R. Mitrovic contribution scientifique : a participé à la rédaction du manuscrit et au développement du design de l'étude et à la révision.



Florina Moldovan a élaboré et planifié cette recherche. Le travail a été réalisé sous la direction du Dr Moldovan à partir de la conception, l'acquisition des résultats, l'analyse et l'interprétation des données jusqu'à la préparation du manuscrit et la soumission pour publication. Le travail a été également financé par les fonds provenant des IRSC (subvention accordée au Dr Moldovan).

ENDOTHELIN-1 IN OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES TRIGGERS NITRIC  
OXIDE PRODUCTION AND UP-REGULATES COLLAGENASE PRODUCTION

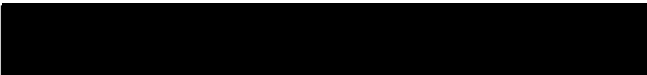
**Christina Alexandra Manacu, Johanne Martel-Pelletier, Marjolaine Roy-  
Beaudry, Jean-Pierre Pelletier, Julio C. Fernandes\*, Fazool S. Shipkolye,  
Dragoslav R. Mitrovic \*\* and Florina Moldovan**

Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Notre-Dame Hospital and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; \* Sacre Cœur Hospital and Department of Surgery, University of Montreal, Quebec, Canada; \*\* INSERM U-349, Lariboisière Hospital, Paris, France.

**Running title:** Endothelin-1 upregulates NO and MMP.

**Keywords:** endothelin-1, metalloproteases, chondrocytes, signalling pathways, nitric oxide, osteoarthritis.

Please address all correspondence and reprint requests to Florina Moldovan, M.D, Ph.D., Assistant Professor, Department of Medicine, University of Montreal, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Notre-Dame Hospital, 1560 rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Tel: (514) 890 8000 ext. 25119 / Fax: (514) 412 -7583.



## SUMMARY

We previously demonstrated that endothelin-1 (ET-1) induces MMP-1 and MMP-13 synthesis, secretion and activation. Here, we investigated the mechanism by which ET-1 induces the production of these two MMPs. Human OA chondrocytes were cultured in the presence of ET-1 with or without inhibitors of protein kinase or LY83583 (an inhibitor of soluble guanylate cyclase and of cGMP) and then MMP-1, MMP-13 and NO levels were measured by ELISA and Griess reaction, respectively. Additionally, iNOS and activated forms of p38 MAP kinase, p44/42, SAP/JNK and serine threonine kinase Akt were determined by Western blot, Bad and Bcl2 proteins by immunocytochemistry and apoptosis by TUNEL. ET-1 greatly increased MMP-1 and MMP-13 production, NO release and iNOS expression. LY83583 decreased the production of both MMPs below basal levels, whereas the inhibitor of p38 kinase, SB202190, suppressed ET-1-stimulated production only. Similarly, the ET-1-induced NO production was partially suppressed by the p38 kinase inhibitor and completely suppressed by the PKA kinase inhibitor, KT5720, and LY83583, suggesting the involvement of PKA and guanylate cyclase in ET-1 signaling pathways. ET-1 does not induce apoptosis and could even have a protective effect through the induction of Akt phosphorylation. In human OA chondrocytes, ET-1 controls the production of MMP-1 and MMP-13. ET-1 also induces NO release via iNOS induction. Thus, ET-1 and NO should become important target molecules for future therapies aimed at stopping cartilage destruction.

## ABBREVIATION LIST

cGMP :	cyclic guanosine monophosphate
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM :	extracellular matrix
ET-1 :	endothelin-1
FCS :	fetal calf serum
IL-1 $\beta$ :	Interleukin 1 beta
iNOS :	inducible NO synthase
L-NAME :	nitro-L-arginine-methyl ester
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MEK1/2 :	mitogen-activated protein kinase kinase 1/2
MMP :	metalloprotease
NO :	nitric oxide
OA :	osteoarthritis
PGHS :	Prostaglandins endoperoxide G/H synthase
PKA :	Protein Kinase A
POD :	horseradish peroxidase
RA :	Rheumatoid arthritis
SAP/JNK :	stress-activated protein kinase /Jun-N-terminal kinase
TIMP-1 :	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TNF- $\alpha$ :	tumor necrosis factor alpha

## INTRODUCTION

Cartilage degradation in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) constitutes a major structural change in the joint, which may severely impair its function causing pain and disability. This degradation is accompanied by the release in the synovial fluid of degraded matrix constituents that primarily result from an increased matrix catabolism (1). Various factors are directly involved in this process. Endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor and pro-mitogen peptide for many cell types, including chondrocytes, was recently identified as one such factor (2, 3).

ET-1 binds to the ET<sub>A</sub> receptor expressed on chondrocytes (4) and triggers a cascade of intracellular events, including phospholipase C activation (5), and an increase in intra-cellular calcium (6,7), prostaglandin production (8) and nitric oxide (NO) release (9). The action of ET-1 on DNA and protein synthesis in chondrocytes is biphasic. The potent initial stimulatory effect of ET-1 decreases progressively with time and is followed by an inhibition (3, 8). The inhibitory effect seem to be mediated by NO and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) produced in response to ET-1 stimulation (8, 9). Additionally, we have recently demonstrated that ET-1 is significantly increased locally in OA cartilage and synovial membrane when compared with normal tissues. In OA cartilage, ET-1 is involved in cartilage catabolism through metalloprotease (MMP) regulation and the induction of type II collagen breakdown (2).

MMPs are a family of structurally related zinc-dependent neutral endopeptidases classified into subgroups of collagenases, gelatinases, stromelysins, membrane-type MMPs and other MMPs (10). When activated, MMPs have a broad spectrum of substrate, including collagens and other matrix macromolecules. As a whole, MMPs play an important role in the extracellular matrix (ECM) physiological remodelling and also in pathological tissue degradation. Among all the MMPs, we have recently demonstrated an induction in the synthesis, secretion and activation

of two collagenases (MMP-1 and MMP-13) by ET-1 (2). These MMPs play an active role in the progression of OA pathology as they are the most effective at initiating collagen destruction during the inflammatory process and the remodelling phase of the disease (11-12).

Another deleterious agent in joint cartilage is the NO radical (13, 14), which down regulates DNA (8) and matrix synthesis (14) and up regulates matrix degradation via increased MMP synthesis (15). Indeed, inhibition of NO production was shown to slow down the progression of OA. It has been demonstrated that, in vitro, NO could also up-regulate MMP synthesis and activity in joint chondrocytes and cartilage (15). In vivo, in an OA animal model, selective inhibition of the inducible NO synthase (iNOS) provides a protective effect on OA joint tissues more specifically in regard to the degradation of the ECM and the down-regulation of MMP (16).

The aim of this study was to further investigate the role of ET-1 in human OA chondrocytes focusing on NO, MMP-1 and MMP-13 production as well as the relevant signaling pathways activated by ET-1 in human OA chondrocytes in regard to these factors.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Specimens.** Human tissues were collected with the consent of patients. The Institutional Ethics Committee Board of Notre Dame Hospital in Montreal, Canada approved the study protocol. Cartilage was obtained from 12 OA patients ( $58 \pm 6$  years, mean  $\pm$  SEM) undergoing total knee replacement. Tissue specimens were embedded in paraffin, sectioned and stained with Safranin O and fast green and evaluated using the Mankin histological/histochemical scale (17). Only tissues corresponding to a moderate degree of the OA severity (Mankin 3-7) were included in this study. Cartilage was sectioned from the tibial plateaus, rinsed, finely chopped and cells released by enzymatic digestion performed as previously

described (11, 2). The cells were seeded in culture flasks at the density of 104 cells per cm<sup>2</sup> and grown to confluence in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) containing 10% heated-inactivated fetal calf serum (FCS; Hyclone, Logan, UT) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL). Only first-passage-cultured cells were used.

**MMP-1 and MMP-13 quantification.** MMP-1 and MMP-13 protein levels were determined in the culture media using specific ELISA assays. The ELISA assay (Amersham Biosciences Corp., Baie d'Urfé, Québec, Canada) for MMP-1 specifically detected the total human MMP-1, ie. active MMP-1, the proform of the protein and the proform complexed with inhibitors such as TIMP-1. The sensitivity of this assay is 1.7 ng/ml, and there is no significant cross-reactivity or interference with MMP-3, MMP-2 and MMP-9. The MMP-13 ELISA assay (R&D Systems Inc, MN, USA) is a monoclonal polyclonal based assay specific for both the proform and the active MMP-13. Its sensitivity is 0.032 ng/ml and there is no cross-reactivity with MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 and MT1-MMP. Results are expressed as ng/5X 10<sup>5</sup> cells .

**The effect of ET-1, protein kinase inhibitors and a guanylate cyclase inhibitor (LY83583) on MMP-1, MMP-13 and NO production.** The signaling pathways involved in the ET-1-induced MMP-13 and MMP-1 production were studied using the effect of selective protein kinase inhibitors (all from Calbiochem EDM Biosciences Inc. San Diego, CA): 1) SB 202190 (1 µM: inhibitor of p38 MAPK); 2) PD 98059 (10 µM: a selective MEK1/2 inhibitor); 3) Wortmannin (100 nM: a PI3K inhibitor); 4) KT5720 (4 µM: a PKA inhibitor); and 5) LY83583 (2 µM: an inhibitor of NO-dependent soluble guanylate cyclase inhibitor). The indicated concentrations of the different inhibitors used in the present study were as previously published (19, 9). OA chondrocytes were pre-incubated for 30 minutes with these inhibitors and then 10 nM of ET-1 was added for 24 hours. Following incubation, the MMP-13 and MMP-1 protein and NO levels were determined in the media.

**Nitric oxide (NO) determination.** Nitrite ( $\text{NO}^2$ ), a stable end product of NO, was measured in the media of cultured cells using a spectrophotometric method based on the Griess reaction (18). To examine the effects of ET-1 on NO production, a dose-response curve was performed by incubating OA chondrocytes for 24 hours with increased concentrations (0 -100 nM) of ET-1 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) or pre-treated with protein kinase inhibitors or a guanylate cyclase inhibitor and ET-1 as described above. Nitric oxide production was also evaluated in the presence of the iNOS inhibitor, L-NIL (Calbiochem EDM Biosc. Inc, San Diego). Chondrocytes were pre-incubated for 30 minutes with 0-50  $\mu\text{M}$  L-NIL and then incubated for 24 hours with 10 nM ET-1. The media were collected and released NO levels determined.

**Western Blot.** Confluent OA chondrocytes were incubated in the presence or absence (control) of 10 nM ET-1, and the cells were lysed in 0.2 ml of lysis buffer (25 mM HEPES, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, pH 7.5). The protein concentration of the lysate was determined with the Bradford dye assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For Western Blot, 10  $\mu\text{g}$  of lysate protein was electrophoresed on a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) discontinuous gradient polyacrylamide gel and transferred electrophoretically onto a nitrocellulose membrane (Hybond C extra; Amersham, Pharmacia Biotech Buckinghamshire, UK). The membranes were immersed overnight in the Super Block Blocking buffer (Pierce, Rockford, IL). They were rinsed and incubated 24 hours at 4°C with one of the mouse monoclonal primary antibody (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada) specifically recognizing: 1) phosphorylated p38 or total p38 (dilution 1/1000); 2) phosphorylated p44/42, (dilution 1/5000); 3) phosphorylated Akt (dilution:1/2000) 4) Phosphorylated SAP/JNK (dilution 1/1000) and actin C-terminal fragment (dilution:1/5000). iNOS was detected with a rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, dilution;1/1000). Following incubation with primary antibody, membranes were carefully washed and reincubated for 1 hour at 4°C with a second antibody. Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase (POD)



conjugate (dilution 1/25000) was used for the detection of the monoclonal antibody and sheep anti-rabbit IgG, POD conjugated (dilution 1/40000) for the polyclonal antibody. Detection was performed using the Super Signal Ultra Western blot chemiluminescence system (Pierce) (11).

**Apoptosis.** Apoptosis was investigated in OA chondrocytes cultured on Lab-Tec chamber slides (Nalge Nunc International, Naperville IL). At confluence, the medium was withdrawn and the cells were incubated for 72 hours at 37° C in DMEM containing 2.5% heat-inactivated FCS in the presence or absence of 10 nM human recombinant ET-1. Apoptotic cells were detected by in situ staining using TUNEL method (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD). The biotinylated nucleotides were detected using a streptavidin horseradish peroxidase (POD) and revealed with the 3'-3'diaminobenzidine (DAB) (Dako Diagnostics). To determine the specificity of staining, two controls were used: 1) negative control where TdT was omitted; and 2) positive control where the cells were pre-treated 15 minutes at 37°C with DNase I (0.1 µg/ml). In addition, immunocytochemical detection of both pro-apoptotic Bad and anti-apoptotic Bcl2 proteins was performed using a specific anti-Bad and anti-Bcl2 antibodies (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The positive cells were detected with a second anti mouse IgG antibody conjugated with POD and revealed with DAB. In order to evaluate the protective or eventually adverse effects of ET-1 on OA chondrocytes, the ratios: Bcl2 +/-Bad + cells were determined in control and ET-1-treated cultures. The results are expressed as mean percentage of positively stained cells.

**Statistical Analysis.** Data are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was assessed by the Mann-Whitney test, and  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

**ET-1 induces MMP-1 and MMP-13 production.** MMP-1 and MMP-13 are the major enzymes involved in the degradation of collagen during the OA process. To determine the mechanism and the intracellular pathways involved in the ET-1-induced MMP-13 and MMP-1 production, we investigated the effects of several protein kinase inhibitors as well as the guanylate cyclase inhibitor (Figure 1). At 10 nM, ET-1 almost doubled the production of both enzymes. SB202190, a p38 inhibitor, completely suppressed the ET-1-stimulated production of both enzymes, whereas the PI3K inhibitor, Wortmannin, and the PKA inhibitor, KT5720, partially decreased the level of only MMP-13. Interestingly, the most potent inhibitor of MMP-1 and MMP-13 production was LY83583, an inhibitor of NO-dependent soluble guanylate cyclase and of cGMP. This agent not only suppressed the ET-1-induced stimulation, but also decreased slightly the level of both enzymes below the basal level. MEK1/2 kinase inhibitor, PD98059, at the concentration tested, induced a variable effect on MMP-13 production, whereas no effect was observed on MMP-1 production.

**ET-1 induces NO production.** Figure 2a shows that ET-1 greatly stimulated NO production and was released in a dose-dependent manner. Incubation with increasing concentrations of ET-1, from 0.1 nM to 100 nM, augmented by almost 12-fold the linear accumulation of NO. To determine the mechanism involved in the ET-1-induced NO production, the effects of the major intracellular signaling pathways were investigated. Data (Figure 2b) show that the ET-1-induced NO release was significantly abolished by p38 inhibition and completely reversed by KT5720, a PKA inhibitor. No significant effect was noted for MEK1 inhibition by PD98059, and an almost total inhibition was obtained with the guanylate cyclase inhibitor LY83583 (Figure 2b). The ET-1-induced NO release occurs via iNOS as shown in the data: 1) the almost complete inhibition of iNOS by 50  $\mu$ M of an allosteric iNOS inhibitor, L-NIL, as expected, almost completely inhibited NO

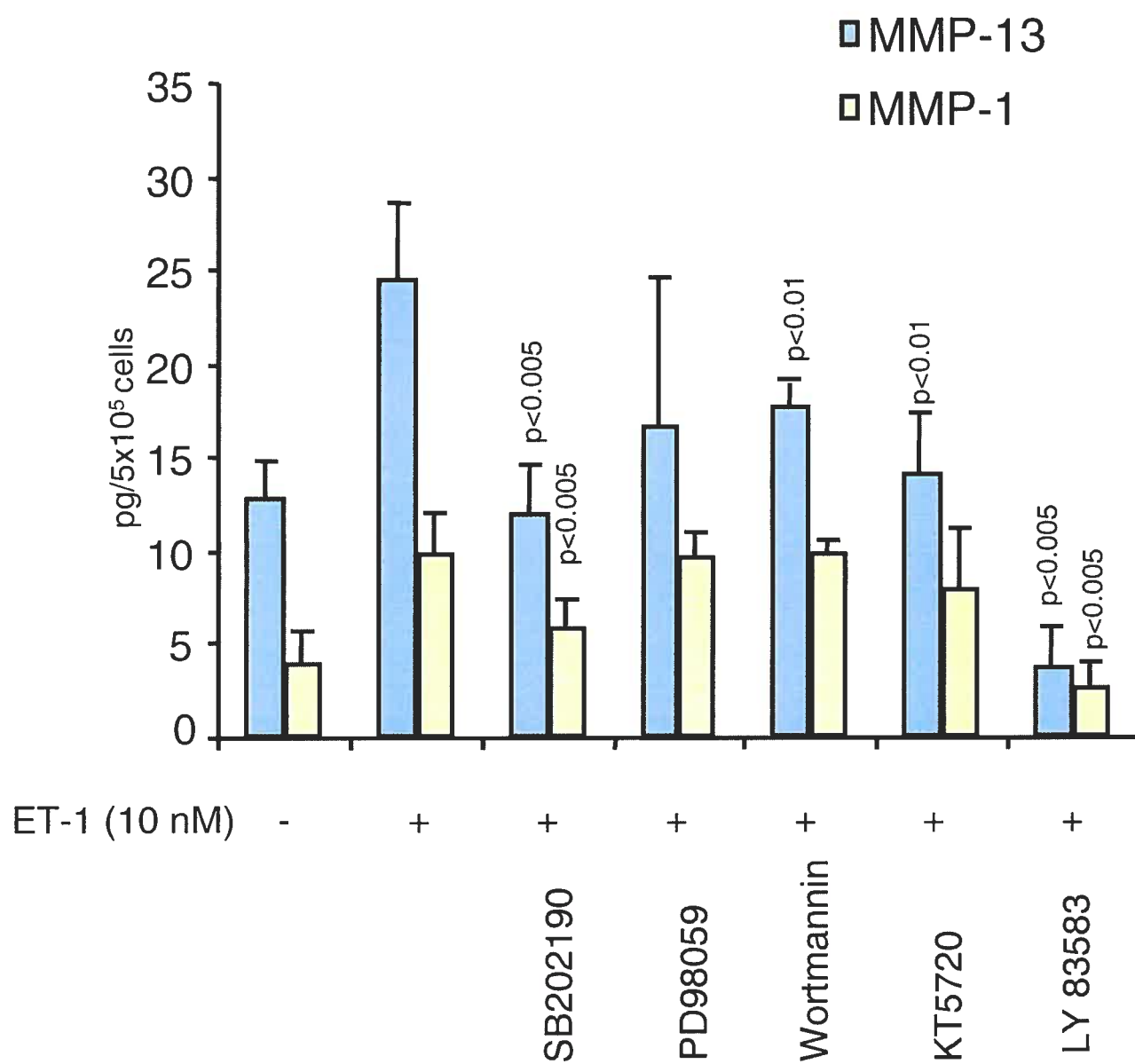
release (Figure 2c) and; 2) increased expression of iNOS protein in response to 24 hours of ET-1 (10 nM) stimulation was found by Western blot (Figure 2d).

**Intracellular protein kinase activation in the presence of ET-1.** Figure 3 (a-d) shows the effects of ET-1 on p38, p44/42, SAP/JNK and Akt kinases as detected by Western blot of cell extracts. ET-1 at 10 nM strongly activated in a time-ordered manner p38, Akt, p44/42, and SAP/JNK through the induction of their phosphorylated forms. Maximal activation was obtained at 2 minutes of cell exposure to ET-1 for Akt, p38 at 10 minutes, for p44/42 kinase at 15 minutes and SAP/JNK at 45 minutes. The effect on phospho p38 kinase and phospho SAP/JNK almost completely disappeared after 45 minutes, whereas the effect on p44/42 kinase decreased, but was still present even at 60 minutes.

**ET-1 did not affect apoptosis.** As ET-1 induces NO release and because the accumulation of NO has been shown to be related to apoptosis, we explored this potential effect. The TUNEL reaction (Figure 4) showed that 72 hours exposure of cells to 10 nM of ET-1 did not affect chondrocyte apoptosis. Accordingly, ET-1 did not induce the production of either anti-apoptotic Bcl2 or pro-apoptotic Bad proteins as revealed by the similar percentage of positively stained cells found for both Bcl2 and Bad in control and ET-1 treated cells (Figure 4b). Moreover, the Bcl2/Bad ratio was similar in both control and ET-1 treated cartilage (Figure 4c). Interestingly, it should be noted that a greater number of chondrocytes expressed Bcl2 than the Bad protein.

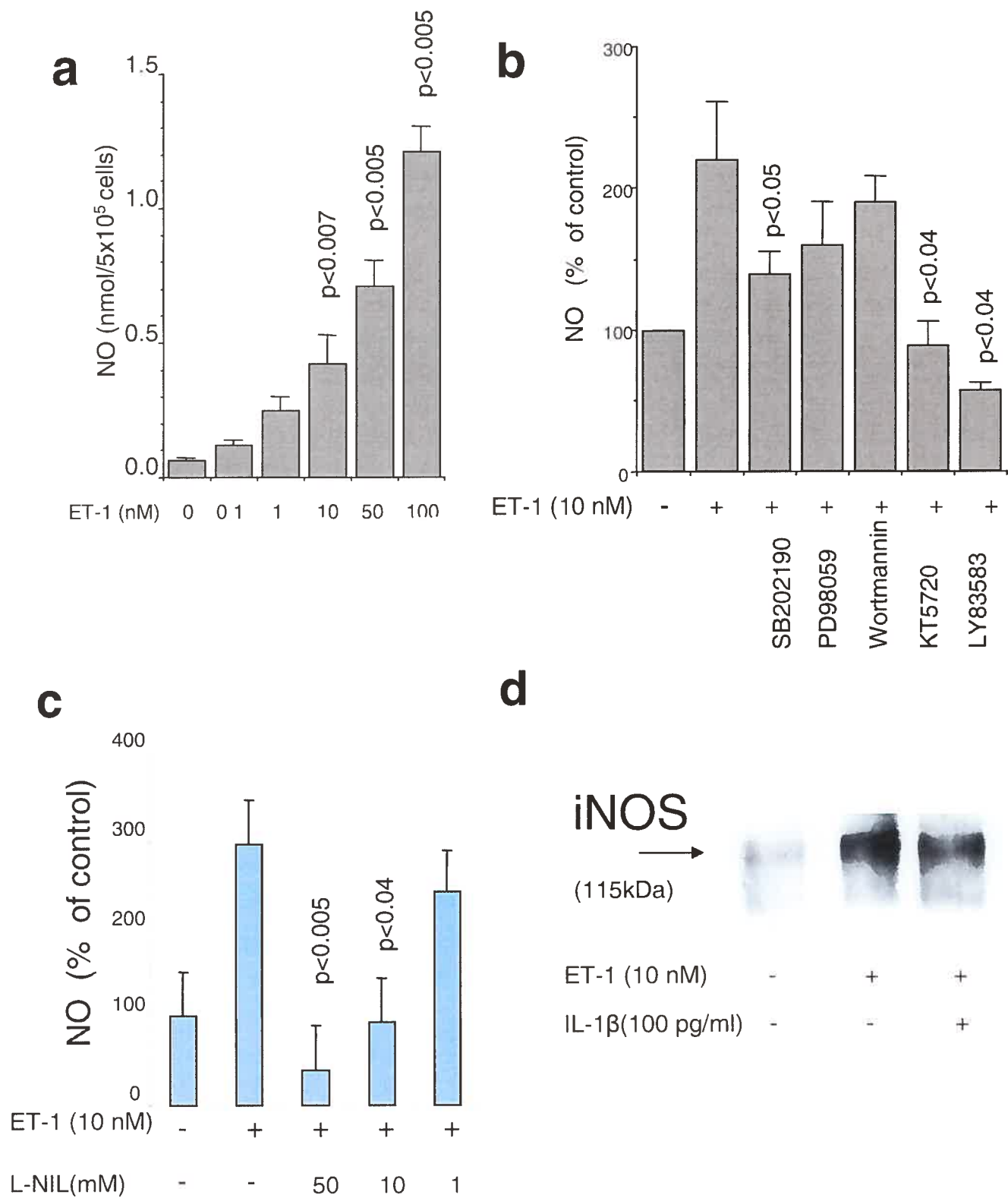
**Figure 1. Effect of protein kinase inhibitors and LY83583 on ET-1-induced MMP-13 and MMP-1 production by human OA chondrocytes.** Confluent monolayer chondrocytes were preincubated with SB 202190 (1  $\mu$ M), PD98059 (10  $\mu$ M), Wortmannin (100 nM), KT5720 (4  $\mu$ M) or LY83583 (2  $\mu$ M) for 30 minutes at 37°C, then challenged with ET-1 for 24 hours. MMP-13 and MMP-1 proteins were measured in the culture media using specific ELISA assays. P values indicate significant differences as compared with ET-1 treatment alone. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments performed in duplicate.

Figure 1



**Figure 2. Effect of ET-1 on NO release from human OA chondrocytes.** a: Dose response curve. Confluent human OA chondrocytes were treated with ET-1 (0-100 nM) at 37°C for 24 hours, and NO level determined in the culture media. b: Effect of protein kinase inhibitors and of guanylate cyclase inhibitor on ET-1-induced NO release in OA chondrocytes. Confluent monolayer chondrocytes were pre-incubated with SB 202190 (1  $\mu$ M), PD98059 (10  $\mu$ M), Wortmannin (100 nM), KT5720 (4  $\mu$ M) or LY83583 (2  $\mu$ M), for 30 minutes at 37°C then challenged with ET-1 for 24 hours, and NO determined in the culture media. Results are expressed relative to untreated control cells (= 100%). Values are the mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments performed in duplicate. P values indicate significant difference between ET-1 treated cells and cells treated with indicated inhibitors. c: Effect of iNOS inhibition on NO release induced by ET-1 in human OA chondrocytes. The chondrocytes were pre-treated with the allosteric inhibitor of iNOS, L-NIL, (0-50  $\mu$ M) for 30 minutes and then incubated with ET-1 (10 nM) for an additional 24 hours. NO level was measured in the culture media. Values are expressed as mean + SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. d: ET-1-induced iNOS in human OA chondrocytes. Confluent monolayer cells were cultured at 37°C for 24 hours with ET-1 (10 nM) and/or IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) (as a positive control). Cell extracts were prepared as described in Material and Methods and iNOS protein was determined by Western immunoblot using specific antiserum to human iNOS. Representative blot of 3 independent experiments is shown.

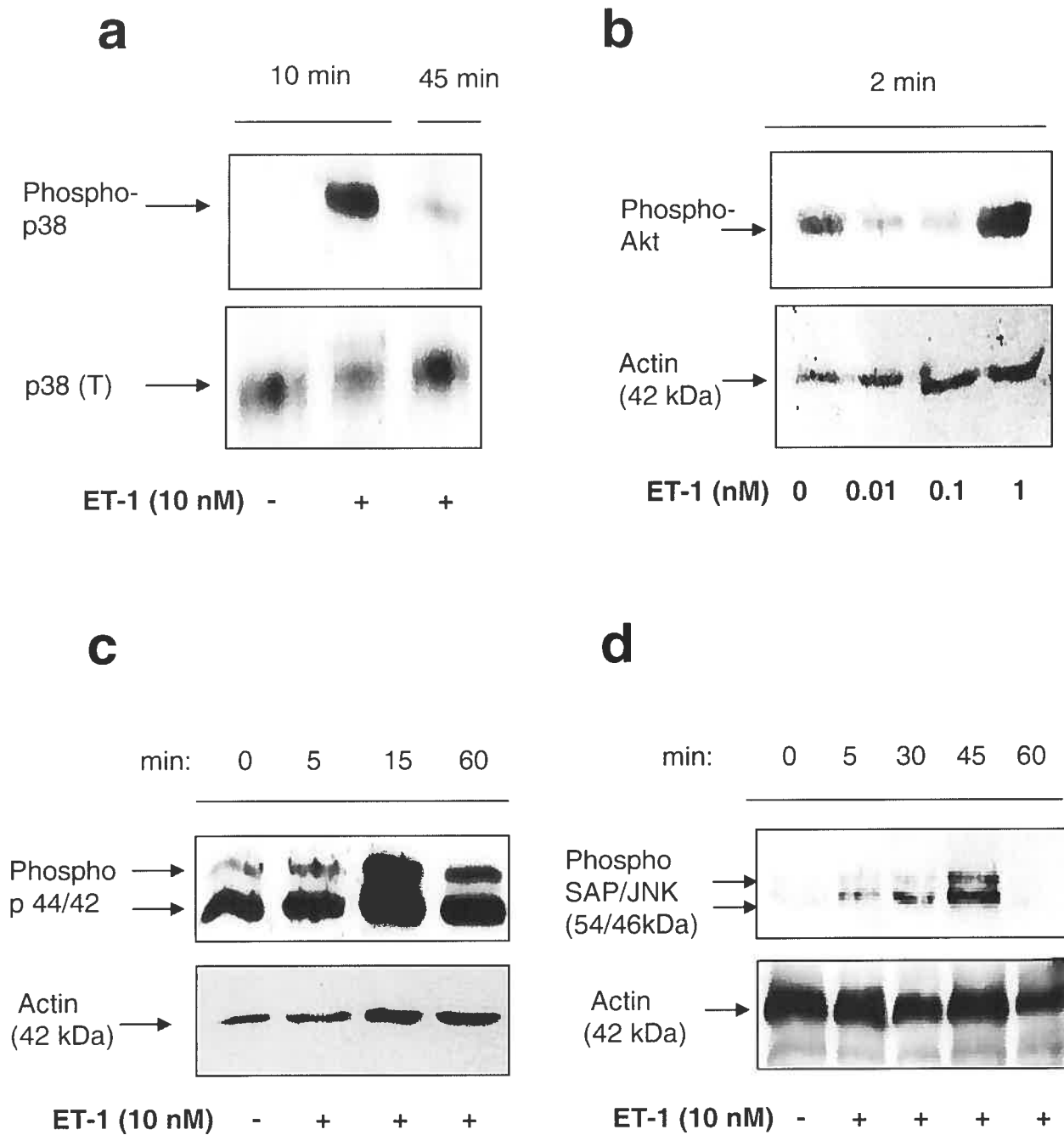
Figure 2



**Figure 3. Activation of p38 MAP kinase, Akt, p44/42 and SAP/JNK by ET-1 in human OA chondrocytes.** a: Confluent human OA chondrocytes were incubated with ET-1 (10 nM) for 10 or 45 minutes and cell extracts were prepared as described in Material and Methods. Western immunoblots using antiserum against activated (phospho-p38) and total p38 MAP kinase (p38 T). A representative result of 3 different experiments is shown. b: Cells were incubated for 2 minutes in presence of ET-1 (0-1 nM) and cell extracts were prepared as described in Materials and Methods. Western immunoblot was done using an antiserum specific for phospho Ser 473 of PKB $\alpha$ . A representative result of 3 different experiments is shown. c: Western immunoblot of p44/42. Confluent human OA chondrocytes were incubated with ET-1 (10 nM) for 0, 5, 15 or 60 minutes and cell extracts were prepared as described in Material and Methods. d: Western immunoblot of SAP/JNK protein kinase. Confluent human OA chondrocytes were incubated with ET-1 (10 nM) for 0, 5, 30, 45 and 60 minutes and cell extracts were prepared as described in Material and Methods. Actin detection was used as a control of the level of proteins loaded. Representative blot of 3 independent experiments is shown.

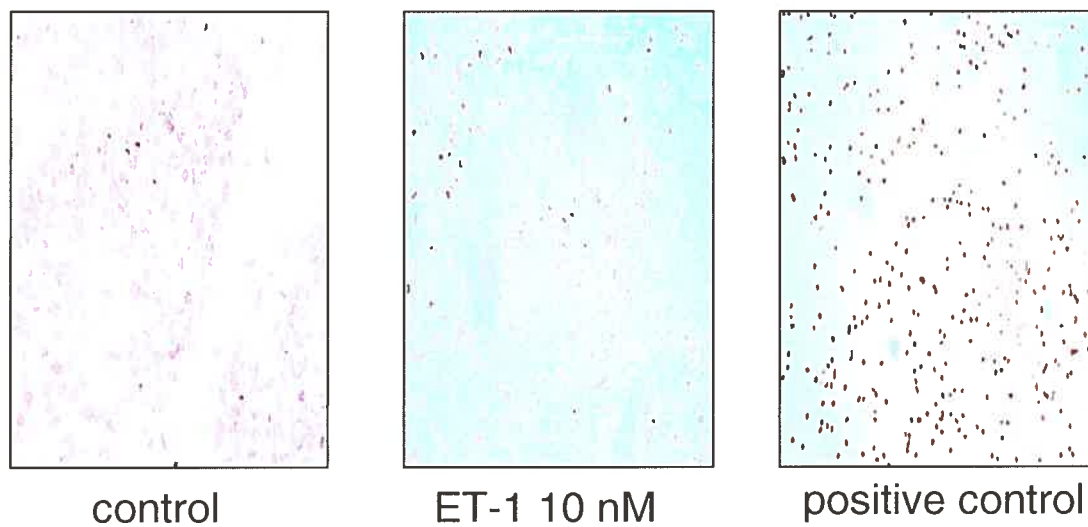
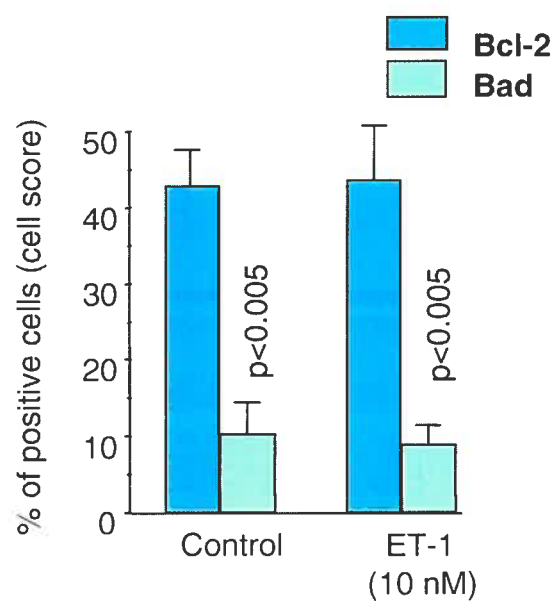
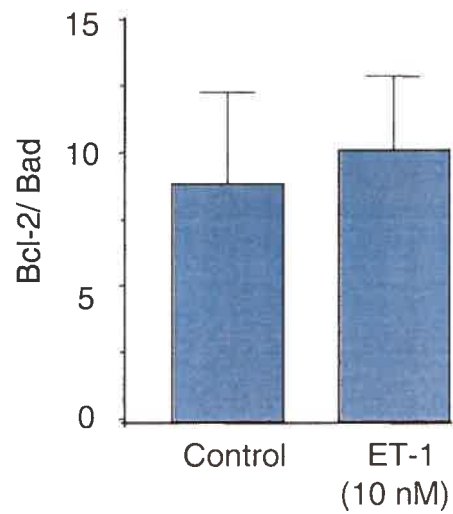


Figure 3



**Figure 4. Effect of ET-1 on chondrocyte apoptosis and cell death.** Confluent human OA chondrocytes were cultured for 72 hours in DMEM containing 2.5 % FCS in the absence or presence of ET-1 and then analyzed by the TUNEL technique and by immunocytochemistry for Bcl2/Bad protein determination. a: The upper panel represents the results with TUNEL reaction performed on OA chondrocytes cultured in absence of ET-1 (control). The middle picture represents TUNEL reaction performed on OA chondrocytes cultured in presence of 10 nM ET-1. The lower panel (positive control) represents cells treated for 15 min with DNase followed by TUNEL reaction. A representative result of 6 experiments performed in duplicate is shown. b: Bcl2 and Bad proteins determined in human OA chondrocytes incubated in the absence (control) or presence of ET-1 (10 nM). Values are mean  $\pm$  SEM percentage of Bcl2 and Bad positive chondrocytes and the p values indicate difference between Bcl2 and Bad. c: Histogram of the ratio Bcl2/Bad in the absence (control) or presence of ET-1 (10 nM). Values are the means  $\pm$  SEM of 6 independent experiments.

Figure 4

**a****b****c**

## DISCUSSION

This study shows that ET-1 causes an overproduction of NO, MMP-1 and MMP-13 in human OA chondrocytes. This confirms and goes beyond previous results (2), which showed that human OA synovial tissue and joint cartilage overproduce ET-1 resulting in an excessive synthesis of MMP-1 and MMP-13, and, in addition, we determined the mechanism by which ET-1 acts in human OA chondrocytes. In this study, strong suppressive effects on MMP-1 and MMP-13 production by OA chondrocytes were also obtained when cells were exposed to LY83583. LY83583 is known to inhibit the NO-dependent production and release of soluble cGMP (20) which mediates the NO-induced effect on smooth muscle cells. As shown by Khatib et al (9), cGMP is necessary for protein synthesis and so this mechanism is blocked when cGMP is inhibited. This further suggests that an excess of NO is harmful to cells, whereas physiological levels of this signaling mediator are necessary for the correct functioning of the metabolic machinery of the cell. Thus, the present findings strengthen the hypothesis ascribing to ET-1 a catabolic function in OA, which drives cell metabolism towards excessive tissue destruction (9, 2).

It is generally accepted that progressive tissue destruction in RA and OA, results from an excessive enzymatic breakdown mediated by various proteolytic enzymes and other catabolic agents such as free radicals and NO (1, 13, 21, 22). Current evidence suggests that ET-1 should also be added to the list of potential deleterious agents that may account for articular cartilage destruction in rheumatological conditions. The action of ET-1 seems to be dual via an increase in MMP and NO production. ET-1-induced stimulation of MMP-1 and MMP-13, as well as the induction of iNOS gene expression with subsequent NO overproduction by OA chondrocytes, may interfere with the IL-1 stimulatory pathway. Indeed, we and others have shown that IL-1 $\beta$  acts on the synthesis of ET-1 (3), which, in turn, can induce IL-1 $\beta$  at the transcriptional level (23).

Increase in MMP levels following chondrocyte stimulation with ET-1, as well as that of NO, are important in terms of tissue destruction in RA and OA (24). At physiological concentrations, NO is an important signaling molecule (25), but when overproduced via iNOS gene activation it is toxic to cells (26). It triggers the transcription of several pro-inflammatory genes (27, 25), interacts with the cysteine residues of many proteins (S nitrosylation) and may alter their structure and function. In the presence of the superoxide anion, NO generates peroxynitrite and hydroxyl radicals that are cytotoxic, inducing peroxydation of lipids and damaging other molecules, such as DNA, and matrix macromolecules. This finally results in the inhibition of many cellular processes that impair the capacity of the cells to synthesize matrix macromolecules and repair damaged tissue (8, 28).

In addition to the findings discussed above, this study sheds light on the major signaling pathways involved in the ET-1-induced MMP-1 and MMP-13 production. In OA chondrocytes, ET-1 seems to stimulate the production of these enzymes through activation of, at least, two kinases, p38 MAP and PKA kinase. As shown by Western blot, incubation of cells for a short period of time with ET-1 results in the phosphorylation of p38 MAP, p44/42, SAP/JNK and Akt kinases and is dependent on the PKA pathway. This effect occurs within minutes following a challenge with ET-1 and disappears after 45 and 60 minutes for the p38 and SAP/JNK kinases respectively. The activation of these kinases is probably necessary for the induction by ET-1 of MMP-1 and MMP-13 production. The inhibition of p38 kinase, and to a lesser degree that of adenylyl cyclase-dependent PKA kinase, is associated with a suppression of the ET-1-induced stimulation of only MMP-13 production. This suggests that these inhibitors are specific for the ET-1 activated pathways since they do not affect the basal levels of MMP-1 and MMP-13. In contrast, the inhibition of NO-dependent cGMP production by LY83853 (20) suppresses both the ET-1-induced and basal productions indicating the possible involvement of different pathways of action. Increase in MMP levels following stimulation with ET-1 involves the ET<sub>A</sub> receptor subtype as shown recently in ovarian cancer, Kaposi sarcoma and fibroblasts (29). Interestingly, the

ET-1-induced NO release appears to involve the ET<sub>B</sub> subtype (30). Articular chondrocytes express both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptor, as we showed previously in Khatib et al. (4). It is possible that ET-1-induced MMP may occur via the ET<sub>A</sub> receptor, while NO release may involve only the ET<sub>B</sub> receptor.

The activation of p38 MAP kinase by ET-1 was also described in osteoblast-like cells specifically expressing prostaglandins endoperoxide G/H synthase 2 (PGHS-2) mRNA (31) and in cardiac myocytes producing B-type natriuretic factor (32). In articular chondrocytes, the activation of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and the induction of both MMP-1 and MMP-13 production by IL-1 $\beta$  also require the activation of p38 MAP kinase (33).

Activation of PKA was shown to be required for the up-regulation of iNOS and the subsequent production and release of NO by several cell types such as vascular smooth muscle cells (34), cardiac myocytes (35) and human macrophages (19). It is also associated with the cytokine-induced NO production in human OA articular chondrocytes (36). Our results strongly suggest that the activation of PKA is also required for the ET-1-induced up-regulation of iNOS expression and subsequent production of NO by human OA chondrocytes. However, PKA activation seems to be less required for the ET-1-induced up-regulation of MMP-13 and not at all for the up-regulation of MMP-1 since the inhibition of PKA does not affect the ET-1-induced overproduction of this enzyme. In this study, subtle differences are shown in the pattern of inhibition of the ET-1-induced overproduction of MMP-1 and MMP-13. The effect of ET-1 on MMP-13 production was more sensitive to the inhibitors of protein kinases than on MMP-1 production. As suggested previously, these variable responses point out to possible different signaling pathways eliciting the ET-1-induced stimulation of these two enzymes (33).

As NO induces apoptosis and cell death in articular chondrocytes at high concentrations (26), we tested the hypothesis that ET-1 may also act in OA through this pathway. Indeed, chondrocyte death may represent one of the

contributing factors in cartilage destruction. It was reported earlier that most of the cells of the superficial layer disappear during cartilage degeneration (37). Interestingly, we have recently shown that the bulk of ET-1 is precisely produced in this layer of OA cartilage (2). However, as shown in this study, ET-1 does not appear to induce chondrocyte apoptosis or cell death. Using the TUNEL technique, which was recently shown to detect both apoptosis and cell death (26), no differences was seen between control cultures and those exposed for 72 hours to ET-1. In agreement with this statement are the results obtained when antiapoptotic Bcl2 and proapoptotic Bad proteins were investigated using specific immunocytochemical techniques. ET-1 does not seem to induce any of these proteins, as the number of positively stained cells does not significantly differ in ET-1-treated from control cultures. Anti-apoptotic Bcl2 protein was found to be strongly expressed in almost half of the cells, whereas the pro-apoptotic Bad factor was expressed in less than 10% of cultured OA chondrocytes, which also indicates that the cells are not entering the pro-apoptotic pathway.

In conclusion, ET-1 appears to be an important factor involved in cartilage destruction via induction of an overproduction of deleterious molecules such as MMPs and NO. NO seems to be a key molecule which is produced in parallel with the ET-1-induced over production of the MMPs. Thus, blocking the effects of ET-1 may become a useful therapeutic approach aimed at stopping cartilage destruction in rheumatic conditions such as RA and OA.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (DSH- 44200 and MOP-57760). We thank Heather Yampolsky for her excellent assistance in manuscript preparation.



## REFERENCES

1. Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., and Howell, D.S. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. W.J. Koopman, editor. Baltimore: Williams & Wilkins 2001; 2195-2245.
2. Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier, J, Pelletier, J-P. Nait M'Barek K, Christgau S, Shipkolye F, Moldovan, F. Endothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via MMP-1 and MMP-13 induction. *Arthritis Rheum.* 2003 Oct;48(10):2855-64.
3. Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Fiet J, Mitrovic DR. Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocyte culture. *Cytokine* 1997; Aug;9(8):556-62.
4. Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Soliman H, Fiet J, Mitrovic DR. Endothelin 1 receptors, signal transduction and effects on DNA and proteoglycan synthesis in rat articular chondrocytes. *Cytokine* 1998; Sep;10(9):669-79.
5. Stojilkovic SS, Catt KJ. Expression and signal transduction pathways of endothelin receptors in neuroendocrine cells. *Front Neuroendocrinol* 1996; Jul;17(3):327-69.
6. Stojilkovic SS, Vukicevic S, Luyten FP. Calcium signaling in endothelin- and platelet-derived growth factor-stimulated chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1994; May;9(5):705-14.
7. Kinoshita A, Tamura T, Aoki C, Nakanishi T, Sobue S, Suzuki F, Takahashi K, Takigawa M. Demonstration of endothelin (ET) receptors on cultured rabbit chondrocytes and stimulation of DNA synthesis and calcium influx by ET-1 via its receptors. *Cell Biol Int* 1995; Aug;19(8):647-54.
8. Khatib, A.M., Ribault, D., Quintero, M., Barbara, A., Fiet, J., and Mitrovic, D.R. The mechanism of inhibition of endothelin-1-induced stimulation of DNA synthesis in rat articular chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 132:25-31.
9. Khatib, A.M., Siegfried, G., Messai, H., Moldovan, F., and Mitrovic, D.R. Mechanism of inhibition of endothelin-1 stimulated proteoglycan and collagen synthesis in rat articular chondrocytes. *Cytokine* 2002; 17:254-261.
10. Nagase, H. and Woessner, J.F. Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-21494.
11. Reboul, P., Pelletier, J.P., Tardif, G., Cloutier, J.M., and Martel-Pelletier, J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human

- chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996; 97:2011-2019.
12. Mitchell, P.G., Magna, H.A., Reeves, L.M., Lopresti-Morrow, L.L., Yocum, S.A., Rosner, P.J., Geoghegan, K.F., and Hambor, J.E. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97:761-768.
  13. Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD, Evans CH. Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; Jul;7(4):377-9.
  14. Gassner RJ, Buckley MJ, Studer RK, Evans CH, Agarwal S. Interaction of strain and interleukin-1 in articular cartilage: effects on proteoglycan synthesis in chondrocytes. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; Oct;29(5):389-94.
  15. Murrell GA, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 5;206(1):15-21.
  16. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Battista JA, Martel-Pelletier J. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998; 41(7):1275-86.
  17. Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L., and Zarins, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971; 53:523-537.
  18. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.
  19. Jovanovic, D., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., and Pelletier, J.P. Interleukin-17 (IL-17) stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998; 160:3513-3521.
  20. Mulsch A., Busse R., Liebau S., Forstermann U. LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 247(1):283-8.
  21. LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum* 2001; 44(9):2078-83.

22. Martel-Pelletier, J., McCollum, R., Fujimoto, N., Obata, K., Cloutier, J.M., and Pelletier, J.P. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994; 70:807-815.
23. Didier N, Romero IA, Creminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem.* 2003 Jul;86(1):246-54.
24. Martel-Pelletier, J., Mineau, F., Jovanovic, D., Di Battista, J.A., and Pelletier, J.P. Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor NF-kB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: Possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). *Arthritis Rheum* 1999; 42:2399-2409
25. Beck, K.F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Messmer, U.K., Muhl, H., and Pfeilschifter, J. Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* 1999; 202 :645-653.
26. Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 2002; 46(8):1986-96.
27. Pfeilschifter, J. Nitric oxide triggers the expression of proinflammatory and protective gene products in mesangial cells and the inflamed glomerulus. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:347-348.
28. Khatib, A.M., Siegfried, G., Messai, H., Quintero, M., Barbara, A., and Mitrovic, R.D. Basal and induced nitric oxide and cGMP productions are decreased in senescent cultured rat articular chondrocytes. *Mech Ageing Dev* 1998; 101:21-32.
29. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Albin A, Natali PG, Bagnato A. Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol.* 2003 Aug;163(2):753-62.
30. Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1994 Aug 26;269(34):21778-85.
31. Windischhofer W, Zach D, Fauler G, Raspotnig G, Kofeler H, Leis HJ. Involvement of Rho and p38 MAPK in endothelin-1-induced expression of PGHS-2 mRNA in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 2002; 17(10):1774-84.

32. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Majalahti-Palviainen T, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Endothelin-1-specific activation of B-type natriuretic peptide gene via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear ETS factors. *J Biol Chem* 2003; 278(6):3969-75.
33. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000; 43(4):801-11.
34. Koide, M., Kawahara, Y., Nakayama, I., Tsuda, T., and Yokoyama, M. Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1993; 268:24959-24966.
35. Oddis CV, Simmons RL, Hattler BG, Finkel MS. Protein kinase A activation is required for IL-1-induced nitric oxide production by cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1996; 271(1 Pt 1):C429-34.
36. Blanco, F.J., Ochs, R.L., Schwarz, H., and Lotz, M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995; 146:75-85.
37. Mitrovic D, Quintero M, Stankovic A, Ryckewaert A. Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* 1983; 49(3):309-16.

## **CHAPITRE VI: MANUCRIT III**

**« STROMELYSIN-1 (MMP-3) REGULATION BY BIG ET-1 (1-38) IN  
HUMAN OA CHONDROCYTES »**

**Marjolaine Roy-Beaudry, Johanne Martel-Pelletier, Janos G. Filep, Jean-  
Pierre Pelletier, Sheik Fazool Shipkolye, Dragoslav R. Mitrovic and Florina  
Moldovan.**

*ARTICLE À SOUMETTRE*

## STROMELYSIN-1 (MMP-3) REGULATION BY BIG ET-1 (1-38) IN HUMAN OA CHONDROCYTES.

Marjolaine Roy-Beaudry<sup>1</sup>, Sheik Fazool Shipkolye<sup>1</sup>, Johanne Martel-Pelletier<sup>1</sup>,  
Janos G. Filep<sup>2</sup>, Jean-Pierre Pelletier<sup>1</sup>, Dragoslav R. Mitrovic<sup>3</sup> and  
Florina Moldovan<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Osteoarthritis Research Unit, Research Center of Centre Hospitalier de l'Université de Montréal-Notre-Dame, Department of Medicine, University of Montreal, Montréal, QC, Canada, <sup>2</sup>Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, <sup>3</sup>INSERM U-349, Lariboisiere, Paris, France.

**Running title:** Big ET-1 and MMP-3

---

Address correspondence to: Florina Moldovan, M.D, PhD, Assistant Professor, Osteoarthritis Research Unit, Hôpital Notre-Dame, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1. Telephone: (514) 890-8000, ext. 25119, Fax: (514) 412-7583, Canada, H2L 4M1. [REDACTED]

## ABSTRACT

Big ET-1 is the precursor of both ET-1 [1-21] and the newly discovered ET-1 [1-32], which is generated from big ET-1 by matrix metalloproteinases (MMPs). During osteoarthritis (OA), activation of MMPs plays a major role in degradation extra cellular matrix (ECM) degradation. In this work, we have studied the impact of big ET-1 (the inactive precursor of ET-1 peptides) on MMP-3 regulation and explored the signalling pathways by which big ET-1 controls MMP-3 production in OA chondrocytes. Chondrocytes were cultured in the presence or absence of big ET-1 [10 nM] and with or without specific inhibitors of different intracellular signalling pathways. MMP-3 gene expression and protein synthesis was determined by Northern blot and Western blot, respectively. The enzymatic activity of MMP-3 was assessed by the use of a synthetic substrate (Azocoll), and phosphorylation of protein kinases was determined by Western blot and immunochemistry. Data showed that big ET-1 induces MMP-3 synthesis in a dose-dependent manner through activation of the p38 MAP kinase pathway and involves both NF- $\kappa$ B and ETS-1 transcription factors. Our results show that inhibition of soluble guanylate cyclase (cGMP) followed by stimulation with big ET-1 inhibits the production of MMP-3 as well as that of Nitric Oxide (NO). Furthermore, inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation completely blocked MMP-3 production, indicating the involvement of the transcription factor NF- $\kappa$ B. Pre-treatment of chondrocytes with phosphoramidon, an inhibitor of endothelin-converting enzyme (ECE) activity, which cleaves big ET-1 into ET-1 (1-21), does not modulate the effect of big ET-1. Our results demonstrate that big ET-1 promotes MMP-3 synthesis and activity in OA chondrocytes thus contributing to ECM degradation and suggest that the observed actions are due to the production of the alternative form of ET-1, ET-1 [1-32].



## INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is characterized by progressive matrix degradation, bone sclerosis, synovial membrane inflammation and formation of osteophytes (1). Many proteases are responsible of that degradation, particularly the MMPs. In OA pathology, there is overproduction of the four main categories of MMPs: collagenases, gelatinases, stromelysin and membrane-type MMP (2). Collagenases are known to degrade the main component of cartilage, which is type II collagen (3). Gelatinases are able to denature collagen while stromelysins cleave proteoglycans, collagens, gelatins and the link protein of aggrecans.

The importance of stromelysin-1 (MMP-3), in addition to proteoglycan degradation, in tissue matrix catabolism is due to its role in the generation the fully active interstitial collagenases (MMP-1) (5), neutrophil collagenases (MMP-8) (6) and gelatinase B (MMP-9) (7). The overproduction of MMP-3 has been linked to connective tissue diseases such as osteoarthritis (8). Like other MMPs, MMP-3 is synthesized as an inactive precursor which need a maturation step in order to become active. Pro-MMP-3 is composed of an NH<sub>2</sub>-terminal propeptide of 82 amino acids, a catalytic domain of 165 amino acids and a COOH-terminal hemopexin/vitronectin-like domain of 213 amino acids (9). Its activation occurs in a stepwise manner. An initial cleavage generates a major intermediate of 53 kDa. Cleavage of a short segment (residues 34-39) located near the middle of the pro-domain produces a small peptide. The 53 kDa intermediate is then converted into the 45 kDa active form by cleavage between the His-82 and Phe-83 bond. This cleavage is carried out by MMP-3 itself (7).

MMP-3 expression is mainly controlled at the transcriptional level. A variety of extra cellular stimuli, including mitogenic growth factors, cytokines, tumor promoters and

contact with the ECM, have been shown to be directly involved in the MMP-3 gene regulation (10-11).

Recent studies from several laboratories, including ours, have demonstrated that endothelin-1 (ET-1), a vasoactive peptide and mitogen, acts as an important autocrine/paracrine modulator of MMPs (12, 13). Recently our laboratory has shown that ET-1 promotes the production of MMP-1 and MMP-13 in OA chondrocytes and that this peptide is synthesized *in situ* in both OA and normal cartilage and synovial membrane, with an up-regulation in OA tissues. ET-1 is a 21 amino acid peptide produced via a biosynthesis pathway that involves conversion of Big ET-1 (1-38) by endothelin converting enzymes (ECE). However, alternative pathways of ET-1 synthesis were recently reported during pathological but not during physiological conditions. Indeed, Fernandez-Patron et al (1999) reported the contribution of the gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in Big-ET-1 metabolism resulting in the formation of a novel 32 amino acid peptide exhibiting potent vasoconstrictor and pro-inflammatory effects (14).

Given the fact that during the OA process there is an excessive synthesis, secretion and activation of a panel of MMPs (7) concomitant with an over expression of ET-1 (15), we examined the potential effect of Big ET-1 on MMP-3 gene expression and protein production in human OA chondrocytes. We also investigated the principal signaling pathways involved in this regulation.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Specimen Selection** Human tissues were collected with the consent of patients. The Institutional Ethics Committee Board of Notre Dame Hospital in Montreal, Canada approved the study protocol. Cartilage was obtained from 12 OA patients ( $58 \pm 6$  years, mean  $\pm$  SEM) undergoing total knee replacement. Tissue specimens

were embedded in paraffin, sectioned and stained with Safranin O and fast green and evaluated using the Mankin histological/histochemical scale (16). Only tissues corresponding to a moderate degree of the OA severity (Mankin 3-7) were included in this study. Cartilage was sectioned from the tibial plateaus, rinsed, finely chopped and cells released by enzymatic digestion performed as previously described (17, 18). The cells are seeded in Falcon culture flasks at high density ( $10^8$  cells per  $175\text{ cm}^2$  flask) and grown to confluence in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) containing 10% heated-inactivated foetal calf serum (FCS; Hyclone, Logan, UT) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL). Only first passage cultured cells were used.

**Immunocytochemistry** Chondrocytes were cultured in Labtech (Nunc) culture chambers, for 48 hours, exposed for 10 minutes to 10 nM Big ET-1 (human recombinant) and proceeded for immunocytochemistry. The slides were incubated with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of monoclonal anti-phospho-p38 antibody (Cell Signalling Technology, Flanders, NJ) and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). The colour was developed by DAB (Dako Diagnostics Canada Inc; Mississauga, Ontario, Canada) containing hydrogen peroxide.

**Northern Blotting.** OA chondrocytes were cultured in  $25\text{ cm}^2$  cell plates in the presence or absence of Big ET-1 (10 nM) and ET-1 (10 nM). After RNA extraction, 5  $\mu\text{g}$  of total RNA were resolved on 1.2% formaldehyde-agarose gel and transferred electrophoretically to nylon membranes (Hybond-N; Amersham, Oakville, Ontario, Canada) in a 10 mM sodium acetate buffer (pH 7.8) containing 20 mM Tris and 0.5 mM EDTA overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The RNA was cross-linked to the membrane by exposure to ultraviolet light. After pre-hybridisation for 24 hours, hybridisation was carried out at  $68^\circ\text{C}$  with MMP-3 RNA probes. The MMP-3 probe was prepared from human MMP-3 full-length cDNA, generously provided by Dr. Murray (University of Washington). The sense probe used is 5'- GAA AGT CTG GGA AGA GGT GAC TCC AC -3' and the anti-sense is 5'- CAG TGT TGG CTG

AGT GAA AGA GAC CC -3'. The RNA probes were transcribed and labelled with digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate (DIG-11-UTP) (Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada) according to the manufacturer's specification. Detection was carried out by chemiluminescence with CDP\* substrate (Roche Diagnostic) and revealed by exposure to Kodak X-AR5 film (Eastman Kodak, Rochester NY). After the first hybridization, the membrane was stripped and re-hybridised with a digoxigenin-labelled probe specific to glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) RNA that is a housekeeping gene. The autoradiographs were scanned with the Chemilmager 4000 (Alpha Innotech, San Leandro, CA) imaging system, and the GAPDH mRNA levels were calculated as the relative expression of the probe to mRNA. Data were expressed as a percentage of the control (basal condition) from each specimen.

**Nitric oxide (NO) determination.** To examine the effects of Big ET-1 on NO production, a dose-response curve was performed by incubating OA chondrocytes for 24 hours with increasing concentrations (0-100 nM) of human recombinant Big ET-1. Additionally, NO production was determined in the culture media collected from OA chondrocytes pre-incubated for 30 minutes with protein kinase inhibitors Bay 117802 (inhibitor of I $\kappa$ B- $\alpha$ ) and Ly 82582 (inhibitor of cGMP) (2 $\mu$ M; Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA), followed by 24 hours incubation with Big ET-1 (10 nM). NO production was measured in the culture medium by nitrite release using the Griess reaction (19).

**Determination of stromelysin-1 activity.** Conditioned culture media was incubated with 12,5  $\mu$ l of 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) (12mM) (Sigma) and Azocoll substrate (Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA) in the presence or absence of EDTA (0.3mM), which served as negative control, and with the reaction buffer (MES buffer: MES (100mM), CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O (10mM), NaCl (150mM) and Brij 35 (0.05%) adjusted to a pH of 5.0). At the end of a 72 hours incubation at 37 C, the solution was centrifuged (12 000 X g for 10 minutes), and absorbance values were obtained at 520 nm (24).

**Western Blot.** Chondrocytes were pre-incubated for 30 minutes with the inhibitors, followed by 24 hours of incubation with 10 nM of Big ET-1. The protein kinase inhibitors used were: 1) SB 202190 (1  $\mu$ M: inhibitor of p38 MAPK: Calbiochem-Novobiochem, San Diego, CA), 2) PD 98059 (10  $\mu$ M: a selective MEK1/2 inhibitor: Calbiochem-Novobiochem,) 3) SN50 (100 nM: inhibitor of NF- $\kappa$ B nuclear translocation, Calbiochem-Novobiochem) 4) Bay117802 (10  $\mu$ M : inhibitor of I $\kappa$ B- $\alpha$ , Calbiochem-Novobiochem, 5) NS 398 (10  $\mu$ M: inhibitor of COX-2, Calbiochem-Novobiochem), 6) 8-bromo-cGMP (50  $\mu$ M: Calbiochem-Novobiochem), 7) KT5720 (4  $\mu$ M: a PKA inhibitor, Calbiochem-Novobiochem), 8) Ly 83583 (2  $\mu$ M: a guanylate cyclase inhibitor, Calbiochem-Novobiochem) and 9) Forskoline (5  $\mu$ M: activator of adenylate cyclase, Calbiochem-Novobiochem) 10) pyrrolidine dithiocarbamate, (PDTTC) (50  $\mu$ M: NF- $\kappa$ B inhibitor, Calbiochem-Novobiochem) 11) Phosphoramidon (100  $\mu$ M: inhibitor of Endothelin converting enzyme, Calbiochem-Novobiochem). Following incubation the conditioned media were used for MMP-3 immunodetection (by Western Blot) and the cells were lysed in 0.2 ml of lysis buffer (25 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml pepstatin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, pH 7.5). The protein concentration of the lysate was determined with the Bradford dye assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For Western Blot, 10  $\mu$ g of lysate protein was electrophoresed on a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) discontinuous gradient polyacrylamide gel and transferred electrophoretically onto a nitrocellulose membrane (Hybond C extra; Amersham, Pharmacia Biotech Buckinghamshire, UK). The membranes were immersed overnight in the Super Block Blocking buffer (Pierce, Rockford, IL). They were rinsed and incubated 24 hours at 4°C with one of primary antibodies specifically recognizing: 1) MMP-3 (monoclonal primary antibody dilution 1/1000) (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada), 2) ETS-1 (1/2000) polyclonal, 3) iNOS was detected with a rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, dilution;1/1000) 4) NF- $\kappa$ B p65 (1/1000) Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA. Following incubation with primary antibody membranes were carefully washed and reincubated 1 hour at 4°C with a second antibody. Anti-mouse IgG, horseradish peroxidase (POD) conjugate, (dilution

1/40000) was used for the detection of the MMP-3 proteins and sheep anti-rabbit IgG, POD conjugated (dilution 1/40000) for the ETS-1 detection (dilution 1/50000), for iNOS detection (dilution 1/50000) and for NF- $\kappa$ B p65 (dilution 1/45000). After careful washing, detection was performed using the Super Signal Ultra.

**Statistical Analysis.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was assessed by the Mann-Whitney test, and  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### **Big ET-1 induces MMP-3 synthesis.**

To assess the action of Big ET-1 (the precursor of both ET-1 (1-21) and ET-1 (1-32)) on the synthesis of MMP-3 by human OA chondrocytes we first compared Big ET-1 and ET-1 effects on the expression of MMP-3 mRNA. Data at figure 1a shown that both Big ET-1 (10 nM), and ET-1 (10 nM), induces significantly increases in the expression of MMP-3 mRNA transcript, after 24 hours stimulation without significant difference between Big ET-1 and ET-1 treatment. Further experiments were performed to assess the effect of Big ET-1 on MMP-3 activity (on the azocoll substrate digestion) and this was showed in figure 1b. Although an increase in enzymatic activity was noted in media from chondrocytes exposed to Big ET-1 (10 nM), compared with the media from control cells (cultured without Big ET-1), substrate digestion after MMP activation by APMA at pH 5.0 was never reached statistical significance ( $p < 0.06$ ). Thus our results indicates that Big ET-1 induced gene expression of MMP-3 and protein synthesis but not its activation.

### **ECE inhibition do not change the effect of Big ET-1 on MMP-3 production in OA chondrocytes**

Figure 2 shows a dose dependent release of MMP-3 protein in the presence of Big ET-1. Incubation with increasing concentrations of Big ET-1, from 0 nM- to 10 nM, greatly increased the linear accumulation of MMP-3 protein, as determined by western blotting. In order to verify if the Big ET-1 effect on the MMP-3 induction is due to the conversion of Big ET-1 into the ET-1 (1-21) peptide achieves by endogenous ECE activity of OA chondrocytes, we determined the effect of Big ET-1 in OA chondrocytes exposed to this in presence or absence of phosphoramidon. From the blot, the results were that phosphoramidon has no effect on Big ET-1 induced MMP-3 since the same dose-dependent response is obtained in the presence or absence of this general inhibitor of ECE activity. This suggest that the production of MMP-3 is due to an alternative active form of ET-1 (other than ET-1

[1-21]), as this peptide is generated only by ECE activity. Similar results were obtained with another ECE inhibitor (FR90151333) (data not shown).

### **cGMP and I $\kappa$ B- $\alpha$ are involved in the signaling pathways leading to the MMP-3 induction by Big ET-1**

To delineate the signaling pathway cascade activated by Big ET in OA chondrocytes we first investigated the impact of pharmacological inhibition of different proteins kinases inhibitors of: p38 MAPK (SB 202190), MEK1/2 (PD 98059), NF- $\kappa$ B nuclear translocation (SN50), inhibitor of I $\kappa$ B- $\alpha$  (Bay117802), COX-2 (NS 398), 6) cGMP(8-bromo-cGMP), PKA (KT5720) 8) a guanylate cyclase inhibitor (Ly 83583), ECE inhibitor (Phosphoramidon) and an activator of adenylate cyclase (Forskoline) followed by cells exposure to the Big ET-1.. The Western blot in fig. 3 shows that MMP-3 protein production was totally inhibited in the presence of Ly85583, (which is a cGMP inhibitor), and in the presence of Bay 117802 which inhibits I $\kappa$ B- $\alpha$  When the cells were firstly treated with inhibitors of p38 MAPK or with the activator of adenylate cyclase (Forskoline) and then exposed in the presence of 10 nM Big ET-1, detected MMP-3 protein was diminished. .This indicates that pro-inflammatory pathways are involved in the signaling pathways in the Big ET-1-induced MMP-3 stimulation.

### **Big ET-1 induces phosphorylation of p38 MAP kinase phosphorylation and active ETS and NF- $\kappa$ B transcriptions factors.**

In order to examine the different signaling pathways involved, chondrocytes were incubated with or without Big ET-1 for 10 minutes, fixed in paraformaldehyde for 10 minutes and then explored by immunocytochemistry using a monoclonal anti-phospho p38 antibody. A positive staining was observed in the nucleoli of he cells treated with Big ET-1 as compared to the control cells where no staining was observed (fig. 4A). This indicate that the p38 MAP kinase activation is produced

We further explored the effect of Big ET-1 on transcription factors activation. Fig 4B shows an induction of the ETS-1 transcription factor in the presence of Big ET-1,



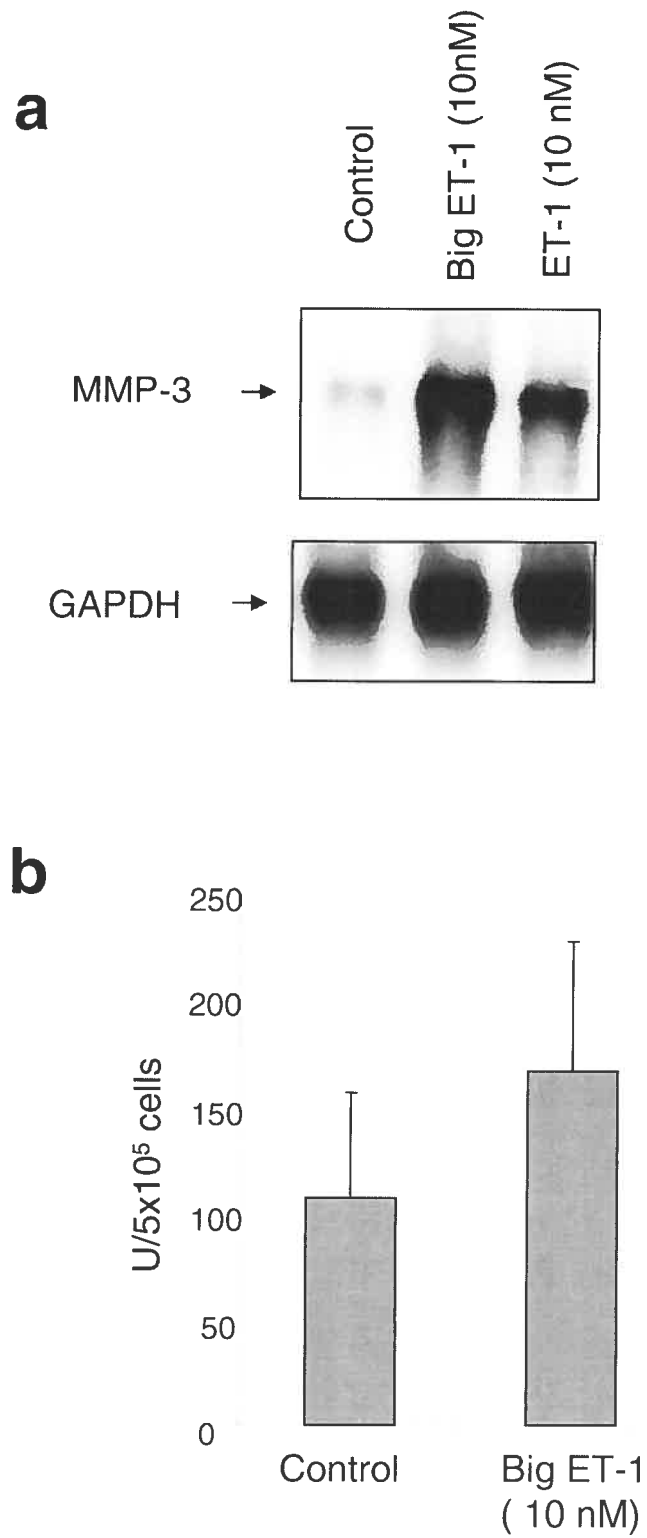
IL-1 $\beta$  and ET-1 as compared to control, un-stimulated cells. In fig. 4C, induction of the NF- $\kappa$ B transcription factor in OA chondrocytes was observed in a time-dependent manner at 10 and 30 minutes.

### **Effect of Big ET-1 on NO production in OA chondrocytes**

Figure 5A shows that Big ET-1 greatly stimulates NO production and that the latter is released in a dose-dependent manner. Incubations with increasing concentrations of Big ET-1, from 0.01 nM to 10 nM, linearly increases the amount of NO released. In an attempt to determine the mechanisms involved in the Big ET-1-induced NO stimulation, we investigated the effects of two inhibitors: inhibitor of NF- $\kappa$ B (Bay 117802) and inhibitor of cGMP (Ly83583). Data from fig. 5A shows that the Big ET-1-induced NO release was significantly abolished by Bay 117802 and Ly83583, which respectively inhibits I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation and NO-dependent soluble guanylate cyclases and of cGMP. In order to verify the involvement of iNOS we showed an increase in the production of the iNOS protein in the presence of Big ET-1 and Big ET-1 + IL-1 $\beta$  (fig. 5B). However, this production was completely abolished in the presence of an MMP-9/MMP-2 inhibitor (SB-3CT) and partially abolished in the presence of PDTC (NF- $\kappa$ B inhibitor).

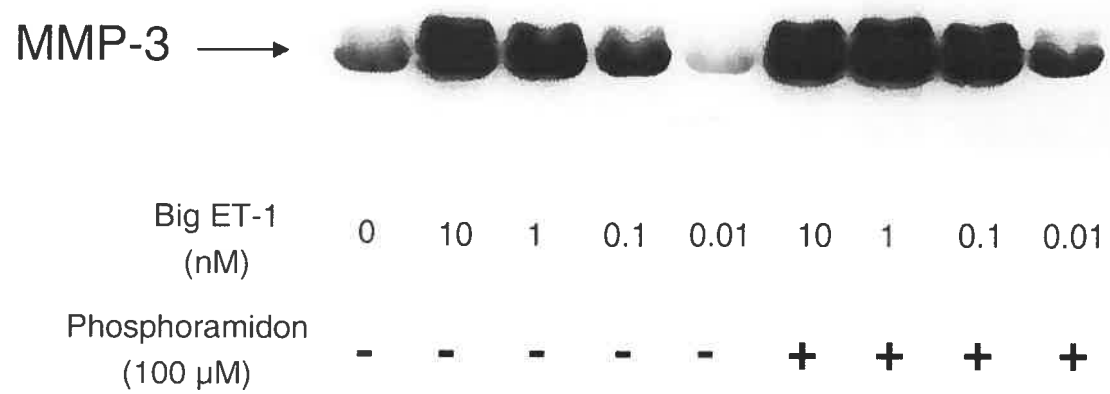
**Figure 1. Effect of Big ET-1 and ET-1 on MMP-3 mRNA and MMP-3 activity.** A) MMP-3 RNA expression in OA chondrocytes treated with Big ET-1 (10 nM) and ET-1 (10 nM) for 24 hours. Northern blot of RNA hybridized with the human MMP-3 and GAPDH probes is shown. B) Stromelysin activity in conditioned media from OA chondrocytes for 24 hours with or without (control) Big ET-1 (10nM). Samples were assayed in duplicate. Statistical significance was never reached ( $p < 0.06$ ). *P* value was determined by Mann-Whitney U test.

Figure 1



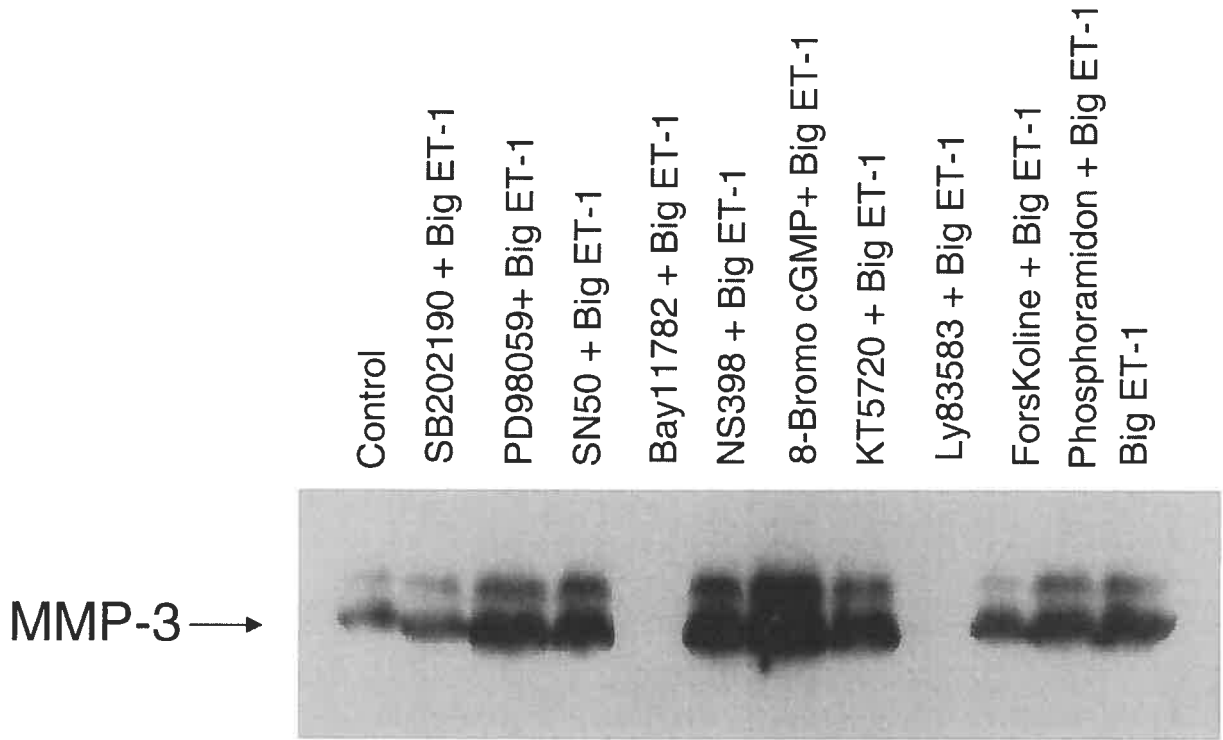
**Figure 2: Dose-dependent stimulation of MMP-3 production by Big ET-1 in human OA chondrocytes.** Quiescent chondrocytes pretreated with phosphoramidon (100  $\mu$ M) for 30 minutes alone (last four conditions) and followed by the treatment with the indicated doses of Big ET-1 for 24 hours. A single band at the location of the MMP-3 molecular weight (43kDa) is seen by Western blot. It represents 3 independent experiments.

Figure 2



**Figure 3: Effects of different inhibitors on the Big ET-1–induced MMP-3 production.** Cells were incubated in the absence (control) or presence of Big ET-1 at a constant dose (10 nM) and with different inhibitors for 24 hours : SB202190 (1  $\mu$ M -inhibitor of p38 MAPK), PD98059 (10  $\mu$ M - inhibitor of MEK (MAPKK)), SN50 (100 nM - inhibitor of NF-kB nuclear translocation), Bay117802 (10  $\mu$ M - inhibitor of I $\kappa$ B- $\alpha$ ), NS 398 (10  $\mu$ M - inhibitor of COX-2), 8-bromo cGMP (50  $\mu$ M - analog of cGMP), KT 5720 (4  $\mu$ M - inhibitor of protein kinase A), Ly 83583 (2  $\mu$ M - inhibitor of cGMP), Forskoline (5  $\mu$ M - activator of adenylate cyclase) and phosphoramidon (100  $\mu$ M – inhibitor of ET-1 converting enzyme). Western blot represent 3 independent experiments.

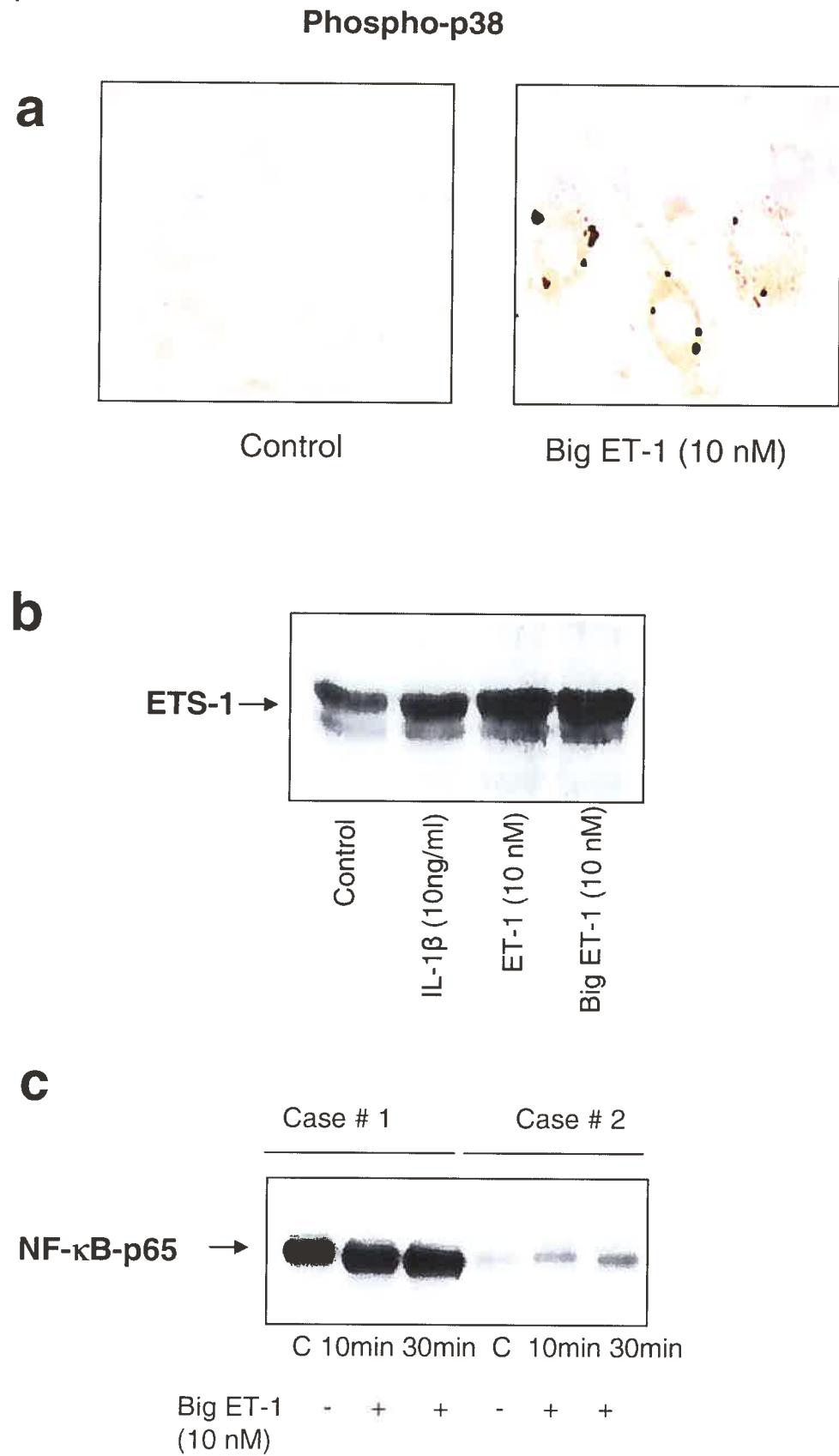
Figure 3



**Figure 4. Big ET-1 signalling pathways.** A) Immunocytochemical detection of phospho-p38 in OA chondrocytes treated in absence (control) or in presence of Big ET-1 (10 nM). Immunocytochemistry represents 3 independent experiments. B) The result of Western blot analysis with human ETS-1 antibody is shown. Confluent cells were made quiescent for 24 hours in serum-deficient medium and treated with treated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), ET-1 (10 nM) and Big ET-1 (10 nM) for 24 hours. C) Time course of the effect of Big ET-1 on the level of NF- $\kappa$ B p65 of human osteoarthritic chondrocytes. Cells were incubated in absence (control) or presence of Big ET-1 (10 nM) for increasing time periods as indicated. Western blots represent 3 independent experiments.

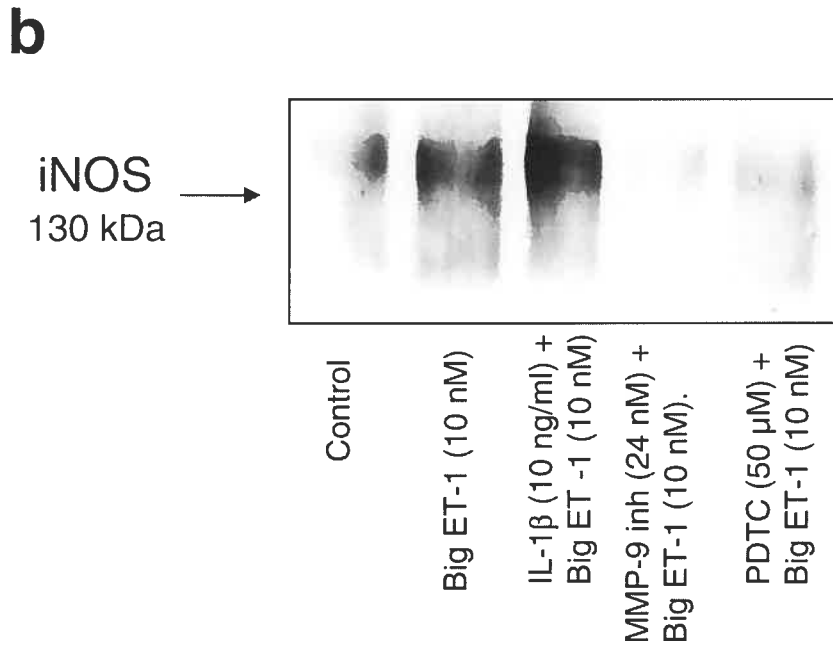
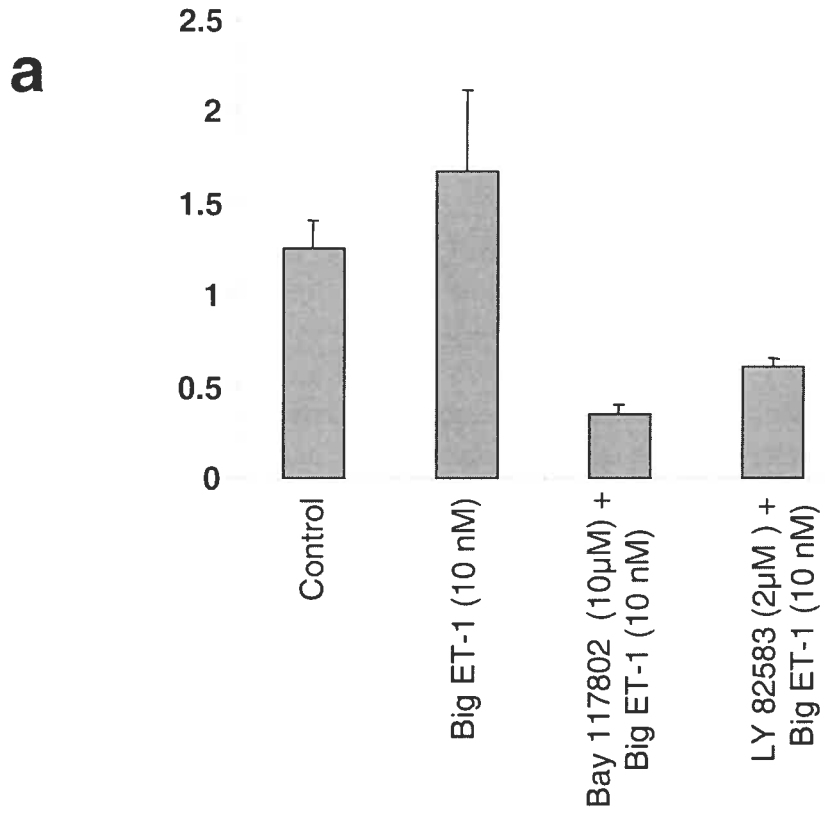


Figure 4



**Figure 5. NO production and iNOS protein detection in OA chondrocytes.** A) Effect of I $\kappa$ B- $\alpha$  inhibitor and of guanylate cyclase inhibitor on Big ET-1-induced NO release in OA chondrocytes. Confluent monolayer chondrocytes were pre-incubated with Bay 117801 (10  $\mu$ M) and LY 82583 (2  $\mu$ M) then challenged with Big ET-1 (10 nM) for 24 hours, and NO determined in the culture media. Results are expressed relative to untreated control cells (=100%). *Values are the mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments performed in duplicate.* B) The result of western blot analysis with human iNOS antibody is shown. Confluent monolayer cells were treated for 24 hours with or without (control) Big ET-1 (10 nM) and with MMP-9 inhibitors (24 nM) and PDTC (50  $\mu$ M – NF- $\kappa$ B inhibitor). Representative of 3 independent experiments.

Figure 5



## DISCUSSION

This study shows that Big ET-1 up regulates MMP-3 synthesis by OA chondrocytes even when endothelin converting enzyme activity (ECE), which is the enzyme responsible for the cleavage of Big ET-1 into ET-1, is inhibited. Moreover, we have investigated the putative signalling pathways through which Big ET-1 could increase the levels of MMP-3. As shown in our previous studies and in the literature, ET-1 is a pro-inflammatory peptide which modulates chondrocytes' metabolism thereby increasing MMP levels and favoring collagen type II degradation during OA. In this work, we shed new light in regard to the involvement of Big ET-1 in stromelysin-1 regulation. This greatly supports the idea that ET-1 should be added to the list of catabolic factors participating in the progression of the cartilage degradation during OA and RA.

Stromelysin-1 (MMP-3) is directly involved in cartilage tissue degradation as is capable of degrading proteoglycans, gelatins, fibronectins and several other tissue types including, of course, type II collagen. It has been shown for a number of years that MMP-3 can activate other MMPs (9, 11). Here, we show that incubation of human chondrocyte cells with Big ET-1 induces significant increases in MMP-3 levels even in the presence of phosphoramidon, a known inhibitor of ECE. Big ET-1, which is a precursor of several ET-1 peptides [1-21, 1-31 and 1-32] thus, increases MMP-3 levels as well as its enzymatic activity. This increase takes place during osteoarthritis (24) and during rheumatoid arthritis (22). Big ET-1, through its action on MMP-3, can thus influence the activation of other MMPs, namely MMP-1, MMP-3 (5), MMP-9 (7) and MMP-8 (6). The fact that in the presence of phosphoramidon (which inhibits endothelin-converting enzymes, but not MMP activity), Big ET-1 is still able to modulate MMP-3 level, strongly suggest that this action is due to the presence of novel ET-1 forms generated by Big ET-1 cleavage.

Recently, it has been demonstrated that gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are able to cleave Big ET-1 to generate the novel form of ET-1 [1-32] (14). This 32 amino acid peptide exhibits potent vasoconstrictor effects shedding light on the involvement of the MMP family in the biosynthetic pathways of endothelin. MMP-9 is synthesized and secreted by many types of cells and tissues including normal and inflamed synovial membrane, whereas MMP-2 is formed in the cell's cytosol. Production of ET-1 [1-32] results in the synthesis and liberation of MMP-9. This forms an autocrine loop thus increasing the amount of Big ET-1 cleavage into ET-1 [1-32] (14), and could also exist in vivo specifically during arthrosis and arthritis because there is an excessive amount of these two gelatinases in affected cartilage. In addition to the cleavage by gelatinases, there may be production of another type of active ET-1 by chymases. These belong to a serine proteases family, similar to chymotrypsin which has the capacity to convert angiotensin I in angiotensin II, a potent vasoconstrictor hormone (2). Chymases would thus have the ability to cleave Big ET-1 to form an active ET-1 consisting of 31 amino acids, known as ET-1 [1-31]. The role of chymases is not well known, but they seem to have an important action in blood vessel vasoconstriction and also in the degradation of the extra cellular matrix in the area surrounding the chondrocytes (2). Cathepsin B, a lysosomal enzyme with maximum activity at low pH, is likely to play an important role in that process as indicated in the various studies showing that cathepsin B level is increased in cartilage lesions with a concomitant decrease in cysteine protease inhibitory activity (3).

The function of ET-1 [1-31] is similar to that of ET-1 [1-21] when the ET<sub>A</sub> receptor is used as reported by Golding et al. (23). As shown in this study, in OA chondrocytes, the MMP-3 gene is induced by both ET-1 and Big ET-1 and a down regulation of MMP-3 was observed when the NF- $\kappa$ B and cGMP cyclic pathway were blocked. It is well known that MMP-3 expression is mainly controlled at the transcriptional level. A number of specific DNA elements in the human MMP-3 promoter have been shown to be important in the regulation of its transcription. It has been demonstrated that the human MMP-3 promoter has two AP-1 sites

(Activating Protein-1) (24) and the role of these in the regulation of MMP-3 was recently documented in OA chondrocytes (25). Binding of AP-1 transcription factors to a conserved phorbol ester responsive element (PRE) in the MMP-3 proximal promoters is essential for both basal and inducible expression (24). Furthermore, the role of NF- $\kappa$ B in the induction of MMP-3 in chondrocytes is supported by recent evidence (26). When MMP-3 genes are induced by IL-1 (interleukin), a down regulation of this gene is observed when ERK, p38, JNK-MAPK (c-Jun N-terminal kinase-Mitogen-activated protein kinase), AP-1 and NF- $\kappa$ B nuclear factors are blocked (26) and additionally, activation of p38 $\alpha$  MAPK results in stabilization of MMP-3 mRNA (27). In our study, when MMP-3 is induced by Big ET-1, involvement of three signaling pathways has been identified: the p38 MAP kinase, the NF- $\kappa$ B transcription factor and one member of the ETS family.

The p38 MAP kinases are a family of serine/threonine protein kinases that play important role in cellular response to external signals including pro-inflammatory cytokines and mitogens (28). Indeed, activation of this pathway by Big ET-1 point to the a role for ET-1 peptides played in tandem with the prototypes of proinflammatory mediators that are IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ .

Our results demonstrate that inhibition of NF- $\kappa$ B activity drastically reduces MMP-3 production by OA chondrocytes stimulated with Big ET-1. This is surprising as no NF- $\kappa$ B consensus sequence has yet been identified in the promoter region of the MMP-3 gene (29), but is consistent with several previous data showing that the NF- $\kappa$ B activity is essential for MMP-3 secretion (25). Indeed, it was suggested that NF- $\kappa$ B regulates the MMP-3 gene via an, as yet unidentified NF- $\kappa$ B element, or via interaction with other transcription factors that regulate MMP-3 expression including AP-1 and ETS transcription factors (27, 30).

Study of mechanisms regulating MMP gene expression indicated the presence of conserved ETS transcription factor binding motifs in the control region of several MMP genes (30, 31). The role of ETS in MMP gene expression was demonstrated in term of interaction with others transcription factors including AP-1. Most ETS proteins are transcription activators, but several are transcription repressors (30). Our study provides new evidence for ETS-1 as a inducer of MMP-3 expression by human OA chondrocytes and in addition to this suggest that Big ET-1 byproducts are closely related to the MMP-3 over expression in these cells. However, the precise function of MMP-ETS-endothelin cascade involved in chondrocytes activation and cartilage destruction is still unclear.

We previously reported a catabolic role for ET-1 in OA cartilage alterations exerted via MMP-1 and MMP-13 up-regulation, increase the net MMP/TIMP ratio which finally lead to an increased collagen type II degradation (7). We suggested that ET-1 could be an attractive factor to target in the conception of new therapeutic approaches for OA and other diseases wherein MMPs are likely to be involved. For further support this catabolic role, we now report that stromelysin-1 (MMP-3) is also up-regulated by peptides from the ET-1 family.

We have demonstrated that Big ET-1, the inactive precursor of ET-1 peptides, promotes MMP-3 production in OA chondrocytes. This was demonstrated by the direct effects of Big ET-1 on MMP-3 gene induction, protein up-regulation and MMP-3 enzymatic activity. Furthermore, we showed that biological effect of Big ET-1 in the presence of the endothelin-converting enzyme inhibitor, is still induced, suggesting that alternative forms of ET-1 are produced in the conditioned media of OA chondrocytes. However, alternative biosynthetic pathways, such those responsible for the genesis of active ET-1 peptides by MMP in OA tissues need to be evaluated further.

**Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (DSH-44200 and MOP-57760). The authors wish to thank Heather Yampolsky for her assistance in manuscript preparation.



**REFERENCES**

1. J.P., Martel-Pelletier, J., and Howell, D.S. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. W.J. Koopman, editor. Baltimore: Williams & Wilkins 2001; 2195-2245.
2. Doggrell SA, Wanstall JC. (2003) Will chymase inhibitors be the next major development for the treatment of cardiovascular disorders? *Expert Opin Investig Drugs*, 12(8): 1429-32.
3. Berardi S, Lang A, Kostoulas G, Horler D, Vilei EM, Baici A. (2001) Alternative messenger RNA splicing and enzyme forms of cathepsin B in human osteoarthritic cartilage and cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 44(8): 1819-31.
4. Chabaud-Riou M, Firestein GS. (2004) Expression and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases-3 and -6 in Rheumatoid Arthritis. *Am J Pathol*, 164(1): 177-184.
5. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (2003) Therapeutic targets in osteoarthritis : from today to tomorrow with new imaging technology. *Ann Rheum Dis*, 62 (Suppl II): ii79-ii82.
6. Nagase H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, 378: 151-160.
7. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (1996) Wanted – the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage. *Br J Rheumatol*, 35 : 818-820.
8. Mudgett JS, Hutchinson NI, Chartrain NA, Forsyth AJ, McDonnell J, Singer II, Bayne EK, Flanagan J, Kawka D, Shen CF, Stevens K, Chen H, Trumbauer M, Visco DM. (1998) Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum*, 41(1):110-21.
9. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. (1990) Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*, 29(44): 10261-10270.
10. Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, Nyberg P, Lindy O, Vesterinen J, Paju A, Konttinen YT, Stenman UH, Salo T. (2003) Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry*, 42(18): 5414-5420.

11. Ogata, Y., Enghild, J. J. and Nagase, H. (1992). Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem*, 267: 3581-3584.
12. Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Alibini A, Natali PG, Bagnato A. (2003) Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol*. 163 (2): 753-762.
13. Rosano L, Varmi M. Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. (2001) Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 61 (22): 8340-8346.
14. Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. (2001) Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1 [1-32]. *FASEB J*, 15: 2230-2240.
15. Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Nait M'Barek K, Christgau S, Shipkolye F, Moldovan, F. 2003 Endothelin-1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via MMP-1 and MMP-13 induction. *Arthritis Rheum*, 48 (10): 2855-2864.
16. Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L., and Zarins, A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*, 53: 523-537.
17. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*, 39(1-2): 237-246.
18. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. (1996) The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. *J Clin Invest*, 97: 2011-2019.
19. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126:131-138.
20. Chavira R Jr, Burnett TJ, Hageman JH. (1984) Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem*, 136(2):446-50.
21. Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. (2002) Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum*, 46(10): 2625-2631.

22. Ribbens C, Martin y Porras M, Franchimont N, Kaiser MJ, Jaspar JM, Damas P, Houssiau FA, Malaise MG. (2002) Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann Rheum Dis*, 61(2):161-166.
23. Golding GB, Dean AM. (1998). The structural basis of molecular adaptation. *Mol Bio Evol*, 15(4): 355-369.
24. Benbow U and Brinckerhoff CE. (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix biology*, 15: 519-526.
25. Bond M, Baker AH, Newby AC. (1999) Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 264(2):561-7.
26. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M (2002). Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol*, 21(3): 251-62.
27. Reunanen N, Li SP, Ahonen M, Foschi M, Han J, Kahari VM. (2002) Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem*, 277(35):32360-8.
28. Crawford HC, Matrisian LM. (1996) Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein*, 49(1-3):20-37.
29. Westermarck J, Kahari VM. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*, 13(8):781-92.
30. Naito S, Shimizu S, Matsuo M, Nakashima M, Nakayama T, Yamashita S, Sekine I. (2002) ETS-1 upregulates matrix metalloproteinase-1 expression through extracellular matrix adhesion in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(1): 130-138.
31. Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Yotsumoto H, Hara T, Kajihara S, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. (2000) Involvement of the ETS-1 gene in overexpression of matrix metalloproteinase-1 in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 60(22):6519-25.

## **CHAPITRE VII : DISCUSSION**

L'ensemble de nos résultats démontre que l'endothéline-1 est un facteur catabolique dans l'arthrose humaine puisqu'elle agit sur la régulation des MMP et favorise la dégradation du collagène de type II. De plus, nous avons caractérisé le mécanisme d'action de l'ET-1 par lequel l'induction des MMP s'effectue.

À l'origine, l'ET-1 a été identifiée dans le système vasculaire et son rôle a surtout été relié à l'activité vasoconstrictrice et la surexpression de l'ET-1 a été associée à des processus pathologiques tel la mitogenèse (Grant *et al*, 2003), la fibrose (Park *et al*, 2002), l'hypertrophie vasculaire (Touyz *et al*, 2003), l'inflammation (Warner *et al*, 1996) et le remodelage tissulaire (Xu S *et al*, 1998). D'après nos résultats, il est maintenant possible d'attribuer à l'ET-1 des propriétés cataboliques lors de l'arthrose et de l'arthrite inflammatoire, deux pathologies caractérisées par une destruction excessive de la matrice extracellulaire. L'ET-1 est donc un peptide ayant des actions multiples dans plusieurs systèmes physiologiques incluant le système locomoteur. Lors de ce travail, nous avons exploré les effets de l'ET-1 de façon à préciser son implication dans l'arthrose humaine en vue de proposer l'inhibition de son action en tant que cible thérapeutique potentielle dans le but d'atténuer la dégradation du cartilage chez les patients atteints de cette maladie.

Dans les tissus articulaires, l'ET-1 est produite par plusieurs types cellulaires: les synoviocytes, les cellules endothéliales, les macrophages, les polymorphonucléaires infiltrant la membrane synoviale lors de l'inflammation et les chondrocytes. La production locale de l'ET-1 dans la membrane synoviale humaine a été initialement démontrée par Miyasaka *et al* 1992, par détermination de l'immunoréactivité de l'ET-1 dans le liquide synovial et le plasma des patients arthritiques. Notre travail a confirmé la présence de l'ET-1 dans la membrane synoviale en démontrant l'expression des ARN messagers et en immunolocalisant le peptide dans les membranes synoviales pathologiques et normales. De plus, nous avons démontré pour la première fois la présence de l'ET-1 dans le cartilage humain arthrosique qui présente, en plus, un taux élevé d'ET-1 comparé au

cartilage normal. Ainsi, l'ET-1 a été principalement trouvée dans la zone superficielle du cartilage et aussi dans les vaisseaux sanguins et dans les cellules de la couche bordante de la membrane synoviale.

Lors de l'arthrose, le métabolisme des chondrocytes est altéré. Il y a une augmentation des MMP et une diminution concomitante des TIMP ce qui crée un déséquilibre dans le ratio MMP/TIMP. D'autres enzymes sont aussi synthétisées de façon accrue par les chondrocytes lors de l'arthrose, par exemple, les collagénases (MMP-1 et MMP-13), la stromélysine (MMP-3) et les gélatinases (MMP-2 et MMP-9). De manière générale, les collagénases sont responsables de la dégradation du collagène natif, la stromélysine et les aggrecanases de la dégradation des protéoglycanes et aggrecanes et les gélatinases de collagène dénaturé. Jusqu'à maintenant, il était suggéré que les cytokines pro-inflammatoires, dont IL-1 $\beta$  (Lee *et al*, 2002), le TNF- $\alpha$  (Malemud *et al*, 2003) et l'IL-17 (Benderdour *et al*, 2002) étaient les principaux facteurs responsables de l'augmentation de la synthèse et de l'activité de ces enzymes de dégradation. Dans cette étude, nous montrons l'augmentation des trois MMP, notamment MMP-1, MMP-3 et MMP-13. Nos résultats indiquent donc un rôle catabolique pour l'ET-1 dans le métabolisme du cartilage OA et possiblement dans d'autres pathologies dans lesquelles il y a induction de collagénases et de stromélysines causant des altérations de la matrice extracellulaire.

Notre étude ne démontre pas clairement si l'ET-1 joue un rôle spécifique dans le déclenchement de la maladie ou si elle serait un médiateur ayant un rôle dans la progression de l'arthrose. La progression du processus OA est généralement divisée en trois stades de la maladie. Dans le premier stade, il y a une perte progressive des protéoglycanes et les fibres de collagène sont dégradées. Dans le stade II, la surface du cartilage est érodée et fibrillée et il y un relâchement de produits de dégradation de la matrice (issus des clivages effectués dans des sites spécifiques) dans le liquide synovial. C'est dans ce stade que le processus inflammatoire apparaît et nous suggérons que l'ET-1 serait principalement

impliquée dans ce stade de la maladie. En fait, nous avons démontré que l'ET-1 induit la MMP-1 et la MMP-13, qui sont les principales enzymes collagénolytiques clivant le collagène de type II et formant des neoépitopes (Mitchell *et al*, 1996). Nous avons démontré que l'ET-1 peut causer la formation de neoépitopes dans la matrice cartilagineuse, mais qu'en absence des forces de pression mécaniques, ces fragments sont très peu libérés. Ces fragments sont des marqueurs spécifiques des maladies articulaires et *in vivo* ils sont retrouvés dans le liquide synovial, le plasma et les urines des patients arthrosiques (Christgau *et al*, 2001). Dans cette étude, nous avons démontré *in vitro* l'effet de l'ET-1 sur la production de ces fragments et leur association avec une surproduction de MMP-1 et de MMP-13. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de mieux préciser le rôle de l'ET-1 dans chacun des stades de la maladie et ces études devraient être menées avec des tissus peu, moyennement ou sévèrement altérés.

La MMP-3 contribue à la dégradation du cartilage articulaire en dégradant les protéoglycanes, la gélatine, la fibronectine et plusieurs types de collagène dont le collagène de type II et elle est de toute évidence augmentée lors de l'arthrose (Masuhara *et al*, 2002; Fernandes *et al*, 2002; Bluteau *et al*, 2001) et lors d'arthrite rhumatoïde (Ribbens C *et al*, 2002). La MMP-3 est une enzyme clé dans la physiopathologie de l'arthrose car elle a la capacité d'activer d'autres MMP (Benbow *et al*, 1996; Ogata *et al*, 1992). Par nos résultats, nous avons démontré que la Big ET-1, le précurseur immédiat de l'ET-1, augmente la production de la MMP-3 ainsi que son action enzymatique. En augmentant la production de la MMP-3, l'ET-1 augmente donc aussi l'activation de la MMP-1, MMP-13, (Suzuki *et al*, 1990) MMP-9 (Ogata *et al*, 1992) et MMP-8 (Moilanen *et al*, 2003) suggérant ainsi que l'ET-1 pourrait jouer un rôle dans la progression de l'arthrose.

Concomitant avec l'induction de la synthèse des collagénases (Roy-Beaudry *et al*, 2003) et celle de la MMP-3, l'ET-1 peut influencer la synthèse des inhibiteurs tissulaires des MMP, les TIMP. Tel que nos résultats le montrent, l'ET-1 diminue la production de la TIMP-1 dans les chondrocytes arthrosiques, cependant cette

diminution reste modeste. Ceci appuie le rôle joué par l'ET-1 dans la régulation de l'équilibre entre les MMP et les TIMP dans les chondrocytes arthrosiques. L'action de l'ET-1 sur les TIMP a été prouvée dans les cellules des carcinomes ovariens, où l'ET-1 diminue la production des TIMP-1 et TIMP-2 (Rosano *et al*, 2001). En diminuant la TIMP-1, l'ET-1 peut augmenter l'accessibilité du domaine catalytique de la MMP-3 car la TIMP-1 interagit directement avec le site catalytique de la MMP-3. (Gomis-Ruth FX *et al*, 1997).

Dans notre deuxième manuscrit (Manacu *et al*) nous avons confirmé que les chondrocytes OA humains produisent spontanément du NO et que la production de NO est augmentée davantage lorsque les chondrocytes sont exposés à l'ET-1. Cette action de l'ET-1 a été démontrée précédemment dans les chondrocytes articulaires provenant des rats normaux. Lorsqu'on compare la quantité de NO relâché par des chondrocytes provenant de rats jeunes et de rats âgés, on constate que les rats âgés en produisent davantage (Khatib *et al*, 2002). D'après la littérature, il est évident que le NO est un facteur catabolique dans la pathophysiologie de l'OA : 1) les niveaux de NO dans le sérum et dans le liquide synovial des patients arthrosiques sont augmentés (Renoux *et al*, 1996) 2) l'accumulation du NO dans le milieu de culture des chondrocytes inhibe leur prolifération et réduit la synthèse des macromolécules de la matrice 3) le NO agit avec le superoxide ( $O_2^-$ ) pour former de la peroxynitrite, un oxydant qui a la capacité d'altérer les structures et les fonctions des protéines par nitration des résidus de tyrosine 4) le NO peut inhiber des fonctions cellulaires importantes pour le métabolisme chondrocytaire, par exemple peut diminuer la capacité de la cellule à synthétiser les composantes de la matrice et à réparer les tissus endommagés.

À des concentrations physiologiques, le NO est une molécule importante dans la signalisation (Beck *et al*, 1999), mais à concentrations élevées, le NO peut induire l'apoptose des chondrocytes articulaires et pourrait donc avoir un rôle dans la pathologie de l'arthrose qui serait directement relié avec la diminution du nombre de chondrocytes dans le cartilage (Blanco *et al*, 1995). Toutes ses données nous



incitent à attribuer au NO un rôle important qui a été prouvé aussi *in vivo* chez l'animal (Pelletier *et al*, 1998). Cependant, tant *in vivo* qu'*in vitro*, le contrôle du relâchement du NO est assumé par les cytokines pro-inflammatoires dont les plus étudiées sont l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Blanco *et al*, 1998; Beck *et al*, 1999). Tel que décrit dans cette étude (Manacu *et al*), l'ET-1 est également impliquée et elle stimule la production du NO, de concert avec les cytokines pro-inflammatoires.

Lors de ce travail, certaines voies de signalisations impliquées dans l'induction de la MMP-1, -13 et -3 par l'ET-1 ont été recherchées. Dans les chondrocytes OA, l'ET-1 semblent induire les MMP-1 et MMP-13 par deux principales voies : la p38 et la PKA. L'activation de ces kinases apparaît nécessaire à l'induction des MMP-1 et MMP-13 par l'ET-1 et leur implication a été démontrée pour les cytokines pro-inflammatoires également (Mengshol *et al*, 2000).

Tel qu'on a pu le constater dans Manacu *et al*, la production de la MMP-13 est significativement diminuée, lors de l'inhibition de la p38 et de la PKA. Également, l'ET-1 conduit à la phosphorylation de la p38 et celle de la p42/44. L'activation de la p38 par l'ET-1 a aussi été décrite dans l'aorte des rats (Kwon *et al*, 2003), les myocytes cardiaques (Sugden *et al*, 2003) et les fibroblastes cardiaques (Cheng *et al*, 2003). Dans les chondrocytes articulaires, les cytokines pro-inflammatoires, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , sont capables d'induire la MMP-1 et la MMP-13 via l'activation de la MAPK p38 (Mengshol *et al*, 2000). L'activation de la voie p38 a été décrite par l'ET-1 dans d'autres pathologies et dans différentes cellules, tandis que notre étude démontre pour la première fois que la phosphorylation de la p38 induite par l'ET-1 est impliquée dans la production de la MMP-13. Puisque l'activation de la p38 accompagne la production des MMP-1 et MMP-13 induites par les cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ainsi que par l'ET-1, cette voie de signalisation devient une cible pour des thérapies futures qui visent à arrêter le processus de dégradation du cartilage. Une revue de littérature tout à fait récente (Kumar *et al*, 2003) indique que l'inhibition sélective de cette voie est importante et prometteuse malgré que les

données cliniques soient encore peu concluantes car les molécules inhibitrices de la p38 produisent des effets de cytotoxicité non négligeables.

La voie de ERK apparaît également activée dans les chondrocytes exposées à l'ET-1 ou à la Big ET-1. Des études ont démontré que cette voie était déterminante dans les fibroblastes cardiaques (Cheng *et al*, 2003) traitées par l'ET-1 et que cette voie est activée dans plusieurs autres types cellulaires par l'ET-1. Effectivement, la voie de ERK est essentielle à l'activation de la synthèse des protéines dans les cardiomyocytes (Wang *et al*, 2002). De plus, l'ET-1 active cette voie pour effectuer la prolifération des cellules des muscles lisses vasculaires (Zhang *et al*, 2003) et des cellules myométriales du rat (Robin *et al*, 2003).

De plus, nous avons démontré qu'une stimulation à l'ET-1 ainsi que par la Big ET-1 induit la production du facteur de transcription ETS dans les chondrocytes. Ce facteur a une implication dans l'arthrose, car il augmente l'expression des MMP-1 et MMP-3 (Naito *et al*, 2002). De plus, une étude démontre que la liaison de l'ETS-1 au site EBS est essentielle à l'activation de la transcription de l'ET-1 (Pikkarainen *et al*, 2003). Une étude plus approfondie de ce facteur de transcription permettrait de comprendre la relation entre l'ETS, les MMP et l'ET-1.

Nous avons également exploré certaines voies de signalisation intracellulaires utilisées par la Big ET-1 pour induire la MMP-3 et avons identifié (comme pour l'ET-1) l'implication de la protéine kinase PKA, et celle de la p38 MAP kinase. De plus, nous avons déterminé par Western Blot la composante p65 du facteur NF- $\kappa$ B et nos résultats montrent qu'elle est induite en présence de la Big ET-1 à 10 et 30 minutes. L'effet de l'ET-1 sur l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B a aussi été observé dans les monocytes THP-1 (Wilson *et al*, 2001). De plus, par approches pharmacologiques et Western Blot, nous avons démontré qu'en présence de l'inhibiteur Bay 117802, il y a inhibition complète de la production de la MMP-3. Cet inhibiteur agit en empêchant la phosphorylation de I $\kappa$ B- $\alpha$  et consécutivement en bloquant l'activation du NF- $\kappa$ B. L'inhibition de l'activation du

facteur NF- $\kappa$ B par le Bay 117802 peut également intervenir dans la suppression du gène de l'ET-1 et l'arrêt de la synthèse de l'ET-1 et du relâchement de l'ET-1 tel que démontré dans des cellules endothéliales (Ohkita *et al*, 2002). Dans ce contexte, des études ultérieures devraient être effectuées afin de clarifier l'implication du facteur NF- $\kappa$ B dans la régulation de la MMP-3 par l'ET-1.

Lors de ce travail, nous avons développé et testé l'hypothèse voulant qu'une nouvelle forme de l'ET-1 soit impliquée dans la production de la MMP-3. À l'aide du phosphoramidon, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (McMahon *et al*, 1991), nous avons démontré que la Big ET-1, le précurseur immédiat de l'ET-1 [1-21] et de la ET-1 [1-32] induit la production de la MMP-3 de manière dose dépendante. La Big ET-1 est un peptide non-actif de point de vue de la vasoconstriction. Lors de la biosynthèse de l'endothéline plusieurs clivages protéolytiques sont essentiels pour la production du peptide actif, l'ET-1 [1-21]. D'après les données de la littérature récente, la Big ET-1 peut subir 3 types de clivages à la suite desquelles l'ET-1 active est générée. Lorsque la Big ET-1 est clivée par l'activité ECE (enzymes de conversion de l'ET-1) la forme 1-21 est produite tandis que lorsqu'elle est clivée par les chymases ou par les gélatinases, de nouvelles formes alternatives en résultent soit la ET-1 [1-31] ou ET-1 [1-32]. Lors de notre travail, nous avons démontré que la Big ET-1 induit la production de la MMP-3 en présence ou en absence d'inhibition de l'activité ECE. Ces résultats suggèrent l'existence de ces nouvelles formes alternatives de l'endothéline qui ont été jusqu'à présent démontrées uniquement *in vitro* (Fernandez-Patron *et al*, 2001, Nakano *et al*, 1997). L'hypothèse la plus probable serait l'existence de la forme constituée de 32 acides aminés qui est issue des clivages effectués par la MMP-2 et/ou la MMP-9 puisque ces deux enzymes sont hyperexprimées dans les tissus arthrosiques. *In vivo*, dans l'articulation ces enzymes pourraient générer de l'ET-1 active créant ainsi une boucle autocrine des médiateurs agissant en cascade.

Comme il a été démontré dans la littérature, lorsqu'il y a une accumulation importante du NO dans le milieu extracellulaire, le NO peut induire l'apoptose et causer la mort des chondrocytes articulaires (Aigner *et al*, 2002). Lors de la dégénérescence du cartilage, la mort des chondrocytes et l'hypocellularité observée dans le cartilage arthrosique représentent un des facteurs contribuant aux modifications de sa structure (Mitrovic *et al*, 1983). Fait important, nous avons démontré que l'ET-1 est principalement présente dans la couche superficielle du cartilage OA, la couche où il y a une perte importante de chondrocytes. Cependant, l'ET-1 n'induit pas l'apoptose ou la mort cellulaire dans les chondrocytes (détectée par technique TUNEL) et ne module pas le ratio entre la Bad (protéine pro-apoptotique) et la Bcl2 (protéine anti-apoptotique). Dans Manacu *et al* nous avons démontré que l'ET-1 induit la forme phosphorylée de l'Akt et en activant la voie de la PKB (Akt), l'ET-1 agit en tant que facteur favorisant la survie cellulaire, ce qui a été démontré dans plusieurs types cellulaires (Iwai-Kanai *et al*, 2003, Ogata *et al*, 2003, Rosano *et al*, 2003).

Notre étude indique que l'ET-1 agit sur la production des MMP et également sur le relâchement du NO par les chondrocytes OA. L'induction de l'oxyde nitrique pourrait être le résultat d'une synthèse accrue de la iNOS qui mènera subséquemment à la production de NO, tel que démontré dans les cellules des muscles lisses et des chondrocytes (Koide *et al*, 1993; Martel-Pelletier *et al*, 1999). L'accumulation du NO dans les chondrocytes animaux exposés à l'ET-1 cause l'inhibition de la synthèse du collagène par ces cellules et le mécanisme de cette inhibition a été corrélée aux taux de NO relâché tel que décrit dans Khatib *et al* 2002. Pour ces raisons nous avons exploré l'effet d'interaction entre l'ET-1 et le NO en mesurant d'une part le relâchement du NO induit par l'ET-1 dans des chondrocytes traités préalablement avec des agents pharmacologiques inhibiteurs des différentes voies de signalisation et d'autre part en déterminant la MMP-1 et la MMP-13 dans les milieux de chondrocytes traités par l'ET-1 et l'inhibiteur sélectif de la iNOS.

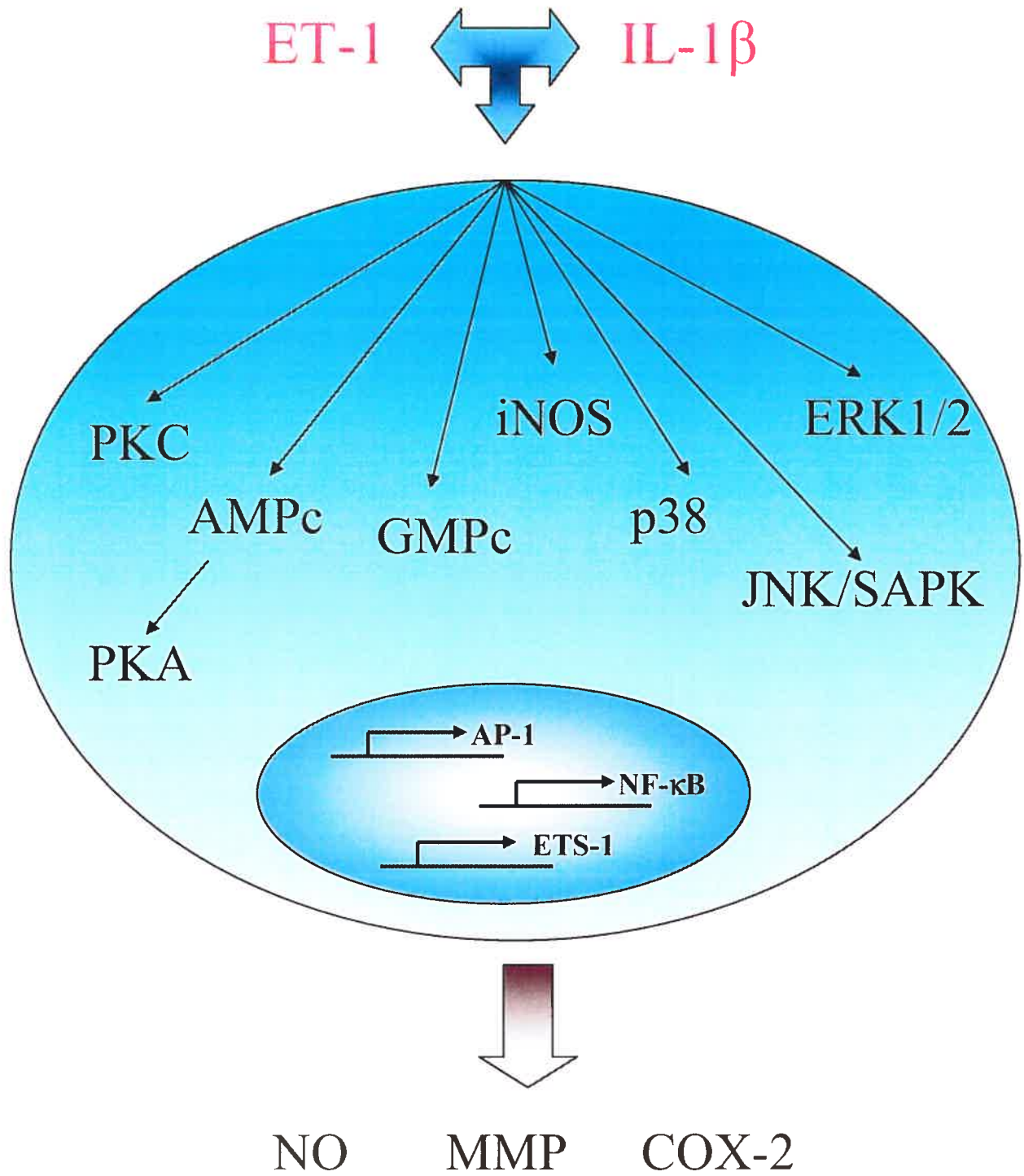
Une fois la formation de l'iNOS inhibée par le *N*-iminoethyl-L-lysine (L-NIL), nous avons exposée les chondrocytes à l'ET-1. Dans un modèle d'arthrose expérimentale induite chez le chien, un inhibiteur de l'iNOS, le L-NIL *N*-iminoethyl-L-lysine, a été montré comme ayant des propriétés de réduction de la progression des changements de la structure du cartilage *in vivo* (Pelletier *et al*, 1998). L'administration du L-NIL diminue la sévérité des lésions associées à une réduction de la synthèse des métalloprotéases, de la production de l'IL-1 $\beta$  et la prostaglandine E<sub>2</sub>. Cependant, des résultats non inclus dans ce mémoire démontrent que lorsque les cellules sont traitées avec le L-NIL en association avec l'ET-1, les niveaux protéiques des deux MMP étudiées (la MMP-1 et la MMP-13) n'ont pas été diminués lorsque comparés aux niveaux produits par les cellules exposées à l'ET-1. Ces observations indiquent que l'effet de l'ET-1 sur les MMP n'est pas directement relié à la production de l'oxyde nitrique libéré par les chondrocytes à la suite de l'induction de l'iNOS. Nous avons développé deux hypothèses qui pourraient expliquer ces résultats.

Notre première hypothèse fait appel à l'action de l'ET-1 via les deux récepteurs connus chez l'humain soit l'ET<sub>A</sub> et l'ET<sub>B</sub>. D'après la littérature, l'effet de l'ET-1 sur les MMP s'effectue via le récepteur ET<sub>A</sub>, ce qui a été démontré dans plusieurs types cellulaires incluant les cellules tumorales d'ovaires (Rosano *et al*, 2001), les cellules de sarcomes de Kaposi (Rosano *et al*, 2003) et les fibroblastes (Xu S *et al*, 1998). L'effet de l'ET-1 sur la libération du NO s'effectue, quant à lui, via le récepteur ET<sub>B</sub> ce qui a été démontré dans des cellules endothéliales. Les chondrocytes possède les deux types de récepteurs, tel qu'on l'a démontré antérieurement, mais le rôle spécifique de chacun des récepteurs n'a pas été déterminé. Il est possible que les MMP soient induites via le récepteur ET<sub>A</sub>, tandis que l'action sur le NO se fait via le récepteur ET<sub>B</sub>. Ceci expliquerait pourquoi l'inhibition de l'iNOS ne diminue pas l'effet de l'ET-1 sur les MMP-1 et MMP-13, même si l'iNOS est induit par l'ET-1. Ces interactions entre les différents médiateurs hyper exprimés par les chondrocytes arthrosiques nécessitent des

investigations additionnelles surtout en terme de séquence d'intervention des facteurs en cascade.

Notre deuxième hypothèse implique la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$ . Parmi les cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  serait le médiateur prototype des facteurs conduisant le catabolisme du cartilage. Cette cytokine peut modifier le métabolisme des chondrocytes et interfère avec d'autres facteurs clés de la dégradation cartilagineuse telles les protéases, les prostaglandines/cyclooxygénase-2 (COX-2), NO/iNOS et plusieurs autres (Boileau *et al*, 2002). L'ET-1 pourrait effectivement induire à la fois le NO et les MMP. L'augmentation du NO et des MMP s'effectue par plusieurs mécanismes suite à leur induction par l'IL-1 $\beta$ , la figure 7 résume cette hypothèse. L'ET-1 agirait sur la régulation de l'IL-1 $\beta$  qui induirait par la suite plusieurs autres facteurs et ceci est en accord avec des travaux indiquant que l'ARN messenger de l'IL-1 $\beta$  est effectivement induit de cinq fois par l'ET-1 ce qui a été récemment démontré dans les astrocytes primaires humains (Didier *et al*, 2003). Un effet de synergie entre l'ET-1 et la cytokine pro inflammatoire l'IL-1 $\beta$  est possible. Lors de ce travail nous n'avons pas étudié les effets possibles de synergie entre l'ET-1 et l'IL-1 $\beta$ . Cependant, d'après la littérature de telles interactions moléculaires existeraient et elles seraient très complexes. D'une part, il a été démontré que l'ET-1 agit en tant qu'inducteur de la transcription de l'IL-1 $\beta$  (en agissant au niveau transcriptionnel) et d'autre part, on a montré que l'IL-1 $\beta$  a un effet sur la synthèse de l'ET-1 (Messai *et al*, 2000).

Même si l'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire contribue à l'avancement des connaissances sur le rôle physiopathologique de l'ET-1 dans les chondrocytes articulaires et le cartilage arthrosique, un grand nombre de questions demeurent en suspens et seuls des études futures répondrons. Pour approfondir davantage ces connaissances, il apparaît d'extrême importance de tester le rôle de l'ET-1 *in vivo* afin de confirmer son effet catabolique dans l'articulation. De plus, des antagonistes spécifiques de chaque récepteur de l'ET-1 sont disponibles dans le commerce et auprès des compagnies pharmaceutiques.

Figure 7. Hypothèse des voies de signalisation impliquant l'IL-1 $\beta$  et l'ET-1

## **CHAPITRE VIII : CONCLUSION**



Dans ce travail, nous avons démontré une relation directe entre l'ET-1 et la dégradation du cartilage humain arthrosique. En tenant compte de la capacité de l'ET-1 d'induire les MMP et le NO, il est évident qu'on peut attribuer à l'ET-1 un rôle catabolique dans la pathologie de l'arthrose. Il est évident que l'arthrose est un processus complexe qui implique la dégradation du cartilage et la perte des composantes matricielles parmi lesquelles le collagène de type II a une place primordiale. La perte de collagène de type II est liée aux changements du métabolisme des chondrocytes occasionnés par plusieurs médiateurs possédant des actions paracrines et autocrines. Parmi ces médiateurs, de concert avec les nombreux facteurs pro-inflammatoires, on retrouve maintenant un nouveau, l'ET-1, qui est synthétisé *in situ* dans l'articulation.

Nous avons démontré pour la première fois chez l'humain, l'expression et la synthèse de l'ET-1 par les différents types cellulaires composant la membrane synoviale et avons déterminé la localisation topographique de l'ET-1 dans le cartilage normal et arthrosique. Nous avons démontré que l'ET-1, en tant que facteur à action autocrine/paracrine, agit sur la synthèse, la sécrétion et l'activité biologique des MMP qui sont directement responsables du clivage de collagène de type II. Ayant également un effet sur la production de NO, l'ET-1 peut contribuer aux lésions cartilagineuses du cartilage.

Ce peptide devient donc un facteur cible pour le développement de traitements thérapeutiques de l'arthrose et possiblement d'autres maladies liées à la dégradation des tissus par les MMP.

## **CHAPITRE IX : BIBLIOGRAPHIE**

Aigner T, Kim HA. (2002) Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum*, 46(8):1986-1996.

Ahn K, Beningo K, Olds G, Hupe D. (1992) The endothelin converting enzyme from human umbilical vein is a membrane bound metalloprotease similar to that from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 8606-8610.

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348:730-732.

Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, Hamaguchi H. (1991) Chromosomal assignments of the human endothelin family gene : the endothelin-1 gene to 6p23 p24, the endothelin-2 gene to 1p34 , and the endothelin-3 gene to 20q13. 2q 13,3. *Am J Hum Genet*, 48: 990-996.

Arner E, Decicco C, Cherney R, Tortorella M. (1997) *J Biol Chem*, 272: 9294-9299.

Baeuerle PA, Baltimore D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 87 (1): 13-20.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, 115: 3719-3727.

Barrett AJ. (1994) Classification of peptidases. *Methods in enzymology*: 1-15.

Battistini B, Chailier P, D'Orleans-Juste P, Briere N, Sirois P. (1993) Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 14: 385-399.

Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H, Pfeilschifter J. (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol*, 202 : 645-653.

Benbow U and Brinckerhoff CE. (1997) The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix biology*, 15: 519-526.

Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Di Battista JA, Reboul P, Ranger P, Martel-Pelletier J. (2002) Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 members by IL-17 and IL-1beta. *J Rheumatol*, 29(6): 1262-1272.

Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. (1997) Specific, high affinity bonding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. *J Biol Chem*, 272: 15496-15500.

Billinghurst RC, Dalhberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR. (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest*, 99(7): 1534-1545.

- Black PN, Ghatei MA, Takahashi K, Bretherton-watt, KT, Dollery CT, Bloom SR. (1989) Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. *FEBS Lett*, 255: 129-132.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. (1995) Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995, 146: 75-85.
- Bloch KD, Friedrich SP, Lee ME, Eddy RL, Shows TB. (1989) Structural organisation and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem*, 264: 10851-10857.
- Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Herbage D, Mallein-Gerin F. (2001) Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*, 1526(2):147-158.
- Boarder MR. (1994) A role for phospholipase D in control of mitogenesis. *Trends Pharmacol Sci*, 15:57-62.
- Bobinac D, Spanjol J, Zoricic S, Maric I. (2003) Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone*, 32(3):284-290.
- Boileau C, Martel-Pelletier J, Moldovan F, Jouzeau JY, Netter P, Manning PT, Pelletier JP. (2002) The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1-converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide. *Arthritis Rheum*, 46(10): 2637-2647.
- Brauchle M, Gluck D, Di Padova F, Han J, Gram H. (2000) Independent role of p38 and ERK1/2 mitogen-activated kinases in the upregulation of matrix metalloproteinase-1. *Exp Cell Res*, 258: 135-144.
- Burch RM, Luini A, Axelrod J. (1986) Phospholipase A2 and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding-proteins in response to alpha 1-adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 7201-7205.
- Chavira R Jr, Burnett TJ, Hageman JH. (1984) Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem*, 136(2):446-450.
- Cheng CM, Hong HJ, Liu JC, Shih NL, Juan SH, Loh SH, Chan P, Chen JJ, Cheng TH. (2003) Crucial role of extracellular signal-regulated kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1 gene expression induced by endothelin-1 in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol*, 63(5): 1002-1011.
- Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, Rosenquist C, Qvist P (2001) Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone*, 29: 209-215.

Creamer P, Hochberg M. (1997) Osteoarthritis. *Lancet*, 350: 503–508.

De Campo BA, Goldie RG, Jeng AY, Henry PJ. (2002) Role of endothelin-converting enzyme, chymase and neutral endopeptidase in the processing of big ET-1, ET-1(1-21) and ET-1(1-31) in the trachea of allergic mice. *Clin Sci (Lond)*, 103 Suppl 48: 353S-356S.

De-Melo JD, Tonussi CR, D'Orleans-Juste P, Rae GA. (1998) Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. *Pain*, 77: 261-269.

De-Melo JD, Tonussi CR, D'Orleans-Juste P, Rae GA. (1998) Effects of endothelin-1 on inflammatory incapacitation of the rat knee joint. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31 Suppl 1: S518-520.

De Nucci G, Thomas R, D'Orléans-Juste P. (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 9797-9800.

De Tejada IS, Mueller JD, De las Morenas A. (1992) Endothelin in the urinary bladder : synthesis of endothelin-1 by epithelia, smooth muscle and fibroblasts suggest autocrine and paracrine cellular regulation. *J Urol*, 148: 1290-1298.

Didier N, Romero IA, Créminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. (2003) Secretion of interleukin-1 $\beta$  by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor- $\alpha$  effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem*, 86: 246-254.

D'Orléans-Juste P, Gratton JP, Leduc R, Bkaily G, Claing A. (1996) L'endothéline : pharmacologie cardiovasculaire et considerations physiopathologiques. *M/S* 12(5) :563-574.

D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J. (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol*, 81(6):503-510.

Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F. (1993) Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding G-Proteins in vasculature. *Endocrinology*, 132: 524-529.

Ehrenreich H, Rieckmann P, Sinowatz F, Weih KA, Arthur LO, Goebel FD, Burd PR, Coligan JE, Clouse KA. (1993) Potent stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. *J Immunol*, 50: 4601-4609.

Faour WH, He Y, He QW, de Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A, Di Battista JA. (2001) Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2

mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem*, 276(34): 31720-31.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*, 39(1-2): 237-246.

Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. (2001) Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1 [1-32]. *FASEB J*, 15: 2230-2240.

Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G. (1989) Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol*, 13 Suppl 5: S220-S222.

Firestein GS, Manning AM. (1999) Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum*, 42: 609-621.

Gassner RJ, Buckley MJ, Studer RK, Evans CH, Agarwal S. (2000) Interaction of strain and interleukin-1 in articular cartilage : effects on proteoglycan synthesis in chondrocytes. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 29(5): 389-394.

Golding GB, Dean AM. (1998). The structural basis of molecular adaptation. *Mol Bio Evol*, 15(4): 355-369.

Gomez De, Alonso DF, Yoshiji H et Thorgeirsson UP. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74; 111-122.

Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*, 389(6646): 77-81.

Grant K, Loizidou M, Taylor I. (2003) Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer*: 88(2): 163-6.

Gray GA, Loffler BM, Clozel M. (1994) Characterization of endothelin receptors mediating contraction of the rabbit saphenous vein. *Am J Physiol*. 266: H959-966.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126:131-138.

Griendling KK, Tsuda T, Alexander RW. (1989) Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in culture vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 264: 8237-8240.

Gui G, Xu D, Emoto N, Yanagisawa M. (1993) Intracellular localization of membrane-bound endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22 Suppl 8:S53-56.

Gutierrez S, Palacios I, Egido J, Gomez-Garre D, Hernandez P, Gonzalez E, Herrero-Beaumont G. (1996) Endothelin-1 induces loss of proteoglycans and enhances fibronectin and collagen production in cultured rabbit synovial cells. *Eur J Pharmacol*, 302: 191-197.

Hascall CV. (1988) *ISI Atlas of science biochem*, 1: 189-198.

Haynes MK, Hume EL, Smith JB. (2002) Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids. *Clin Immun*, 105(3) : 315-325.

Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. (1993) Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*, 91: 1367-1373.

Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, Nakanishi S, Imura H. (1992) Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem*, 267(26):18797-18804.

Howard P, Plumpton C, Davenport A. (1992) Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertension*, 10: 1379-1386.

Huang W, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. (2002) Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *J Cell Biochem*, 85(2):295-303.

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. (1989) The human endothelin family : three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 : 2863-2867.

Irons CE, Murray SF, Glembotski CC. (1993) Identification of the receptor subtype responsible for endothelin-mediated protein kinase C activation and atrial natriuretic factor secretion for atrial myocytes. *J Biol Chem*, 268: 23417-23421.

Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Adachi S, Fujita M, Akao M, Kawamura T, Kita T. (2003) Effects of endothelin-1 on mitochondrial function during the protection against myocardial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 305(4): 898-903.

Janes RW, Peapus DH, Wallace BA. (1994) The crystal structure of human endothelin. *Nature Structural Biol*, 1: 311-313.

Johnson GD, Stevenson T, Ahn K. (1999) Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J Biol Chem*, 274 : 4053-4058.

Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL. (1998) RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem*, 265: 368-374.

Jozsef L, Khreiss T, Fournier A, Chan JS, Filep JG. (2002) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol*, (5):1167-1174.

Jovanovic D, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. (1998) Interleukin-17 (IL-17) stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, 160: 3513-3521.

Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*, 268(25): 19126-19133.

Kaushal GP, Shah SV. (2000) The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family. *J Clin Invest*, 105: 1335-1337.

Khatib AM, Ribault D, Quintero M, Barbara A, Fiet J, Mitrovic DR. (1997a) The mechanism of inhibition of endothelin-1-induced stimulation of DNA synthesis in rat articular chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 132: 25-31.

Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Fiet J, Mitrovic DR. (1997b) Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocyte culture. *Cytokine*, 9: 556-562.

Khatib AM, Siegfried G, Messai H, Moldovan F, Mitrovic DR. (2002) Mechanism of inhibition of endothelin-1 stimulated proteoglycan and collagen synthesis in rat articular chondrocytes. *Cytokine*, 17(5): 254-262.

Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Soliman H, Fiet J, Mitrovic DR. (1998) Endothelin 1 receptors, signal transduction and effects on DNA and proteoglycan synthesis in rat articular chondrocytes. *Cytokine*, 10: 669-679.

Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, et al. (1988) Structure-activity relationships of endothelin : importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun*, 156: 1182-1186.



Kinoshita A, Tamura T, Aoki C, Nkanishi T, Sobue S, Suzuki F, Takahashi K, Takigawa M. (1995) Demonstration of endothelin receptor on cultured rabbit chondrocytes and stimulation of DNA synthesis and calcium influx by ET-1 via its receptors. *Cell Biol Internat*, 19(8): 647-654.

Kirkham BW, Navarro FJ, Corkill MM, Barbatis C, Panayi GS. (1989) Immunohistochemical localization of interleukin-1 in rheumatoid and osteoarthritic synovial membrane. *Br J Rheumatol*, 29 (suppl. 2): 47.

Kloog Y, Sokolovsky M. (1989) Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *TIPS*, 10: 212.

Koide M, Kawahara Y, Nakayama I, Tsuda T, Yokoyama M. (1993) Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*, 268: 24959-24966.

Kosaka T, Suzuki N, Matsumoto H, Itoh Y, Yasuhara T, Onda H, Fujino M. (1989) Synthesis of the vasoconstrictor peptide endothelin in kidney cells. *FEBS Lett*, 249(1):42-6.

Kramer BK, Smith TW, Kelly RA. (1991) Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H<sup>+</sup> exchanger. *Circ Res*, 68(1):269-279.

Kumar S, Boehm J, Lee JC. (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2 : 717-726.

Kwon S, Lee WJ, Fang LH, Kim B, Ahn HY. (2003) Mitogen-activated protein kinases partially regulate endothelin-1-induced contractions through a myosin light chain phosphorylation-independent pathway. *J Vet Med Sci*, 65(2): 225-230.

Lajeunesse D. (2004) The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12 Suppl A: S34-8.

Lange M, Pagotto U, Hopfner U, Ehrenreich H, Oeckler R, Sinowatz F, Stalla GK. (1994) Endothelin expression in normal human anterior pituitaries and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 79: 1864-1870.

Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR. (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem*, 269: 9352-9360.

Lee CY, Chiappinelli VA. (1989) Sequence homology between safaratoxins S6 and porcine endothelins. *Toxicon*, 27: 277-279.

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. (2003) Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res*, 288(1): 208-217.

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Zafarullah M (2002). Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol*, 21(3): 251-62.

Lincoln TM. (1989) Cyclic GMP and mechanisms of vasodilatation. *Pharmac Therap*, 41: 479-502.

Little PJ, Neylon CB, Tkachuk VA, Bobik A. (1992) Endothelin-1 and endothelin-3 stimulate calcium mobilization by different mechanisms in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 183: 694-700.

Liu Y, Geisbuhler B, Jones AW. (1992) Activation of multiple mechanisms including phospholipase D by endothelin-1 in rat aorta. *Am J Physiol*, 262(4 Pt 1): C941-9.

Malemud CJ, Islam N, Haqqi TM. (2003) Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. *Cells Tissues Organs*, 174(1-2):34-48.

Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L., and Zarins, A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*, 53: 523-537.

Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (1996) Wanted – the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage. *Br J Rheumatol*, 35 : 818-820.

Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, Di Battista JA, Pelletier JP. (1999) Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor  $\kappa$ B together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: Possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). *Arthritis Rheum*, 42: 2399-2409.

Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (2000) Etiopathogenesis of osteoarthritis. In *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*, edn 14. Baltimore : Lippincott, Williams & Wilkins : 2195-2215.

Martel-Pelletier J, Pelletier JP. (2003) Therapeutic targets in osteoarthritis : from today to tomorrow with new imaging technology. *Ann Rheum Dis*, 62 (Suppl II): ii79-ii82.

Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. (1989) Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(1):74-80.

Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. (2002) Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum*, 46(10): 2625-2631.

McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, Kinninmonth A, Weidner J, Mumford R, Liew FY. (1996) Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med*, 184(4):1519-1524.

McMahon EG, Palomo MA, Moore WM, McDonald JF, Stern MK. (1991) Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big endothelin-1-(1-39) in vivo and conversion of big endothelin-1-(1-39) to endothelin-1-(1-21) in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(3):703-707.

Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. (2000) Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum*, 43(4): 801-811.

Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. (2001). IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res*, 29(21): 4361-4372.

Messai H, Khatib AM, Lebrun G, Aubin P, Florina M, Jean F, Mitrovic DR. (2000) Endothelin-1 in monolayer cultures of articular chondrocytes from young and old rats: regulation by growth factors and cytokines. *Mech Ageing Dev*, 114: 37-48.

Milner JM, Elliott SF, Cawston TE. (2001) Activation of procollagenases is a key control point in cartilage collagen degradation: interaction of serine and metalloproteinase pathways. *Arthritis Rheum*, 40(9): 2084-2096.

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE. (1996) Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 97: 761-768.

Mitrovic D, Quintero M, Stankovic A, Ryckewaert A. (1983) Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest*, 49(3):309-316.

Mitrovic D, Mansat C. (2000) Le cartilage: un tissu conjonctif très différencié. Éd Privat: 25-38.

Miyasaka N, Hirata Y, Ando K, Sato K, Morita H, Shichiri M, Kanno K, Tomita K, Marumo F. (1992) Increased production of endothelin-1 in patients with inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*, 35: 397-400.

Mohammed KS, Guise TA. (2003) Mechanisms of osteoblastic metastases: role of endothelin-1. *Clin Orthop*, 415S: S67-S74.

Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, Nyberg P, Lindy O, Vesterinen J, Paju A, Konttinen YT, Stenman UH, Salo T. (2003) Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry*, 42(18): 5414-5420.

Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. (1997) Collagenase-3 is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*, 40: 1653-1661.

Moldovan F, Pelletier JP, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. (2000) Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1beta and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 8(3):186-196.

Murrell GA, Jang D, Williams RJ. (1995) Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 5;206(1) : 15-21.

Nagase H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, 378: 151-160.

Naito S, Shimizu S, Matsuu M, Nakashima M, Nakayama T, Yamashita S, Sekine I. (2002) ETS-1 upregulates matrix metalloproteinase-1 expression through extracellular matrix adhesion in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(1): 130-138.

Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. (1997) Selective conversion of Big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol*, 159(4): 1987-1992.

Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP. (2000) The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol*, 165: 3402-3410.

- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. (1992) Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem*, 267: 3581-3584.
- Ohkita M, Takaoka M, Shiota Y, Nojiri R, Sugii M, Matsumura Y. (2002) A nuclear factor-kappaB inhibitor BAY 11-7082 suppresses endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Jpn J Pharmacol*, 89(1): 81-84.
- Ohnaka K, Takayanagi R, Nishikawa M, Haji M, Nawata H. (1993) Purification and characterization of a phosphoramidon sensitive endothelin-converting enzyme in porcine aortic endothelium. *J Biol Chem*, 268: 26759-26766.
- Ohwaki T, Sakai H, Hirata Y. (1993) Endothelin-converting enzyme activity in human serum lipoprotein fraction. *FEBS Lett*, 320: 165-168.
- Okishima N, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Cui P, Kitamura H, Tamaki T, Kido H. (2001) Determination of the levels of novel 31-amino-acid endothelins and endothelins in human lungs. *Life Sci*, 681: 2073-2080.
- Park JB, Schiffrin EL. (2002) Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1. *Am J Hypertens*, 15(2 Pt 1): 164-169.
- Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Di Battista JA, Martel-Pelletier J. (1998) Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum*, 41: 1275-1286.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J. (2002) The Novartis-ILAR Rheumatology Prize 2001 Osteoarthritis: from molecule to man. *Arthritis Res*, 4(1):13-9.
- Pietraszek MH, Takada Y, Takada A. (1992) Endothelins inhibits serotonin-induced platelet aggregation via a mechanism involving G-protein kinase C. *Eur J Pharmacol*, 219: 289-293.
- Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Majalahti-Palviainen T, Vuolteenaho O, Ruskoaho H (2003) Endothelin-1-specific activation of B-type natriuretic peptide gene via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear ETS factors. *J Biol Chem*, 278(6): 3969-75.
- Radin EL, Rose RM. (1986) Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop*, 213: 34-40.
- Radin EL, Swann DA, Paul IL, McGrath PJ. (1982) Factors influencing articular cartilage wear in vitro. *Arthritis Rheum*, 25: 974-978.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. (1996) The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. *J Clin Invest*, 97: 2011-2019.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Benderdour M, Ranger P, Bottaro DP, Martel-Pelletier J. (2001) Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: involvement of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade. *Arthritis Rheum*, 44: 73-84.

Renoux M, Hilliquin P, Galoppin L, Florentin I, Menkes CJ. (1996) Release of mast cell mediators and nitrites into knee joint fluid in osteoarthritis-comparison with articular chondrocalcinosis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 4: 175-179.

Resink TJ, Scott-Burden T, Bulher FR. (1988) Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 157: 1360-1368.

Reunanen N, Li SP, Ahonen M, Foschi M, Han J, Kahari VM. (2002) Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem*, 277(35): 32360-32368.

Ribbens C, Martin y Porras M, Franchimont N, Kaiser MJ, Jaspar JM, Damas P, Houssiau FA, Malaise MG. (2002) Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann Rheum Dis*, 61(2):161-166.

Robin P, Boulven I, Desmyter C, Harbon S, Leiber D. (2002) ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283: C251-C260.

Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Alibini A, Natali PG, Bagnato A. (2003) Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol*. 163 (2): 753-762.

Rosano L, Varmi M, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. (2001) Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 61 (22): 8340-8346.

Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, M'Barek KN, Christgau S, Shipkolye F, Moldovan F. (2003) Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction. *Arthritis Rheum*, 48(10):2855-2864.

Rubanyi GM, Polokoff MA. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46 (3): 325-415.

Saito I, Koshino T, Nakashima K, Uesugi M, Saito T. (2002) Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritis knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 10: 156-162.

Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, 348: 732-735.

Santé Canada. (2003) L'arthrite au Canada: Une bataille à gagner. Ottawa : Santé Canada.

Sasaki T, Hong MH. (1993) Endothelin-1 localization in bone cells and vascular endothelial cells in rat bone marrow. *Anat Rec*, 237: 332-337.

Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR. (1997) The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Biol*, 12: 1371-1387.

Shimada K, Takahashi T, Tanzawa K. (1994) Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cell. *J Biol Chem*, 269: 18275-18278.

Shimamoto H, Shimamoto Y, Kwan CY, et al. (1992) Participation of protein kinase C in endothelin-1-induced contraction in rat aorta: studies with a new tool, calphostin C. *Br J Pharmacol*, 107: 282-287.

Shishodia S, Aggarwal BB. (2002) Nuclear factor-kappa B activation: a question of life and death. *J Biochem Mol Biol*, 35: 28-40.

Shukla SD, Halkenda SP. (1991) Phospholipase D in cell signalling and its relationship to phospholipase C. *Life Sci*, 48: 851-866.

Silver FH, Bradica G, Tria A. (2001) Relationship among biomechanical, biochemical, and cellular changes associated with osteoarthritis. *Crit Rev Biomed Eng*, 29(4) :373-91.

Spiropoulos K, Trakada G, Nikolaou E, Prodromakis E, Efremidis G, Pouli A, Koniavitou A. (2003) Endothelin-1 levels in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Respir Med*, 97(8): 983-989

Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 364-368.

Stern P, Tatrai A, Semler ED, Lee KS, Lakatos P, Strielman PJ, Tarjan G, Sanders LJ. (1995) Endothelin receptors, second messengers, and actions in bone. *J Nutr*, 125 : 2028S-2032S.

Stojilkovic SS, Vukicevic S, Luyten FP. (1994) Calcium signalling in endothelin-and platelet-derived growth factor-stimulated chondrocytes. *J Bone Miner Res*, 9(5): 705-714.

Stremme S, Duerr S, Bau B, Schmid E, Aigner T. (2003) MMP-8 is only a minor gene product of human adult articular chondrocytes of the knee. *Clin Exp Rheumatol*, 21(2): 205-209.

Su S, Grover J, Roughley PJ, DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Zafarullah M. (1999) Expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases gene family in normal and osteoarthritic joints. *Rheumatol Int*, 18: 183-191.

Sugden PH. (2003) An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*, 35(8): 871-886.

Supatapone S, Simpson A, Ashley C. (1989) Free calcium rise and mitogenesis in glial cells caused by endothelin. *Biochem Biophys Res Comm*, 165: 1115-1122.

Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. (1990) Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*, 29(44): 10261-10270.

Takahashi K, Totsune K, Khamuro T, Sone M, Murakami O, Shibahara S. (2001) Expression of three vasoactive peptides, endothelin-1, adrenomedullin and urotensin-II in various human tumor cell lines. *Int Conf Endothelin*, 7: Abs O39.

Takuwa Y, Masaki T, Yamashita K. (1990) The effects of the endothelin family peptides on cultures osteoblastic cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Comm*, 170: 998-1005.

Thonar EJ, Shinmer M, Lohmander LS. (1993) Body fluids markers of cartilage changes in osteoarthritis. In: Moskowitz RW. *Osteoarthritis, edition of rheumatic disease clinics of North America*. Philadelphia: WB Saunders: 635-638.

Touyz RM, Schiffrin EL. (2003) Role of endothelin in human hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*, 81(6): 533-541.

Van der Laan WH, Quax PH, Seemayer CA, Huisman LG, Pieterman EJ, Grimbergen JM, Verheijen JH, Breedveld FC, Gay RE, Gay S, Huizinga TW, Pap T. (2003) Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. *Gene Ther*, 10(3): 234-242.



Van Wart, H. E., & Birkedal-Hansen, H. (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 5578-5582.

Vankemmelbeke NM, Jones GC, Fowles C, Ilic MZ, Handley CJ, Day AJ, C. Knight CG, Mort JS, Buttle DJ. (2003) Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters. *Eur J Biochem*, 270(11): 2394-2403.

Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moomaw C, Hersh LB. (1990) The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalase). *J Biol Chem*, 265 : 14150-14155.

Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Williams SC, Cloutier DE, Yanagisawa M. (1998) Role of Endothelin-1/Endothelin-A receptor-mediated signalling pathway in the aortic arch patterning of mice. *J Clin Invest*, 102(1): 22-33.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, (332): 411-415.

Yanagisawa M. (1997) Molecular genetic dissection of the endothelin system. C.O.E. Int Symp Osaka, Japan. Abstract 0-21.

Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N, Hammer RE. (1998) Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development*, 125(5):825-36.

Yoshida H, Imafuku Y, Ohhara M, Miyata M, Kasukawa R, Ohsumi K, Horiuchi J. (1998) Endothelin-1 production by human synoviocytes. *Ann Clin Biochem*, 35: 290-294.

Wang L, Proud CG. (2002) Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ Res*, 91(9):821-829.

Warner TD, Klemm P. (1996) What turns on the endothelins ? *Inflamm Res*, 45(2): 51-3.

Wharton J, Rutherford RAD, Walsh DA, Mapp PI, Knock GAK, Blake DR, Polak JM. (1992) Autoradiographic localization and analysis of endothelin-1 binding sites in human synovial tissue. *Arthr Rheum*, 35 : 894-899.

Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. (1993) DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet*, 30(10):852-856.

Wilson SH, Simari RD, Lerman A. (2001) The effect of endothelin-1 on nuclear factor kappa B in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(5): 968-972.

Windischhofer W, Zach D, Fauler G, Raspotnig G, Kofeler H, Leis HJ. (2002) Involvement of Rho and p38 MAPK in endothelin-1-induced expression of PGHS-2 mRNA in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*, 17(10): 1774-1784.

Woessner JF. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB j*, 5: 2145-2154.

Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M. (1994) ECE-1 : a membrane-bound metalloprotease that catalyze the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*, 78: 473-485.

Xu S, Denten CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM. (1998) Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31 (Suppl 1):S360-S363.

Zhang YM, Wang KQ, Zhou GM, Zuo J, Ge JB. (2003) Endothelin-1 promoted proliferation of vascular smooth muscle cell through pathway of extracellular signal-regulated kinase and cyclin D1. *Acta Pharmacol Sin*, 24(6) :563-568.