

Université de Montréal

Le rôle de la 12/15-Lipoxygénase dans la pathogenèse de l'arthrose

Par

Loures Habouri

Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire par article présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en pharmacologie

Avril 2018

©, Loures Habouri, 2018.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Le rôle de la 12/15-Lipoxygénase dans la pathogénèse de l'arthrose

Présenté par :
Loures Habouri

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hassan FAHMI
Directeur de recherche

Dre Johanne MARTEL-PELLETIER
Co-directrice

Dr Guy ROUSSEAU
Président-rapporteur

Dr Pierre HADDAD
Membre de jury

RÉSUMÉ

L'ostéoarthrose (OA) est la maladie rhumatismale la plus fréquente au monde. Elle est reconnue pour être une maladie multifactorielle affectant différents tissus de l'articulation. Il est reconnu que la 12/15-lipoxygénase (12/15-LOX) catalyse la génération de divers médiateurs lipidiques anti-inflammatoires et qu'elle est impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires et dégénératives. Or, son implication dans la pathophysiologie de l'OA n'est pas encore établie. C'est pourquoi, pour ce projet, nous avons investigué le rôle de la 12/15-LOX dans la pathogenèse de l'OA.

En premier, nous avons démontré que la 12/15-LOX, induite par une déstabilisation du ménisque médiale (DMM) et par l'âge, est surexprimée dans le cartilage des souris sauvages *Wild-Type* (WT) durant le développement de l'OA. L'augmentation de l'expression protéique de la 12/15-LOX obtenue par immunohistochimie est accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'ARNm. Ensuite, nos travaux par histologie ont démontré que la dégradation du cartilage est plus prononcée chez les souris déficientes pour le gène de la 12/15-LOX dans le modèle chirurgical de la DMM et celui relié à l'âge. Une augmentation de l'expression des médiateurs cataboliques (ADAMTS5 et MMP-13) et inflammatoires (iNOS et mPGES-1), des produits de dégradation du collagène de type II (C1, 2C) et de l'aggrécane (VDIPEN) chez les souris 12/15-LOX^{-/-} comparativement aux WT a été démontré. Ensuite, la stimulation des explants de cartilage avec de l'IL- α , la présence des métabolites de 12/15-LOX (13-HODE, 15-HETE et LXA4) diminuait le niveau de MMP-13, PGE₂ et NO. Cependant, la LXA4 a indiqué une meilleure inhibition des réponses cataboliques et inflammatoires dans le cartilage. Enfin, nos résultats suggèrent qu'à la suite de l'injection péritonéale de la LXA4 des souris WT, des effets

protecteurs *in vivo* ont été démontré, puisque la LXA4 réduit la sévérité de la dégradation du cartilage induite par la DMM.

L'ensemble de ces résultats indiquent que la 12/15-LOX possède un rôle important dans la pathogénèse de l'OA. L'activation de la 12/15-LOX et de ses métabolites pourrait représenter une voie prometteuse dans l'élaboration de nouvelles thérapies pour l'arthrose.

Mots-clés : ostéoarthrose, cartilage, 12/15-LOX, LXA4, 13-HODE, 15-HETE, MMP-13, ADAMTS5, iNOS, mPGES-1, C1, 2C, VDIPEN.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatic disease in the world. It is recognized as a multifactorial disease affecting different tissues of the joint. It is known that 12/15-lipoxygenase (12/15-LOX) catalyzes the generation of various anti-inflammatory lipid mediators and is involved in several inflammatory and degenerative diseases. However, its involvement in the pathophysiology of OA is not yet established. Hence, in this project, we have investigated the role of 12/15-LOX in the pathogenesis of OA.

First, we demonstrated that 12/15-LOX is overexpressed in the cartilage of wild-type (WT) mice during the development of OA induced by age or by the destabilization of the medial meniscus (DMM)-induced OA. The increase in protein expression of 12/15-LOX, obtained by immunohistochemistry, is accompanied by an increase in expression at the mRNA level. Subsequently, our histological work demonstrated that the deletion of the 12/15-LOX gene accelerated cartilage erosion with age and after DMM surgery. We have also shown that there is an increase in the expression of catabolic mediators (ADAMTS5 and MMP-13) and inflammatory mediators (iNOS and mPGES-1), as well as degradation products of type II collagen (C1, 2C) and aggrecan (VDIPEN) in 12/15-LOX - / - mice compared to WT. We subsequently demonstrated that the presence of 12/15-LOX metabolites 13-HODE, 15-HETE and LXA4 decreased the level of MMP-13, PGE₂ and NO following stimulation of cartilage explants with IL- α . However, the metabolite LXA4 produced a better inhibition of catabolic and inflammatory responses in cartilage. Finally, our results suggest that LXA4 has protective effects *in vivo*, as it reduces the severity of cartilage degradation induced by DMM following its peritoneal injection in WT mice.

Together, these data indicate that 12/15-LOX has an important role in the pathogenesis of OA. Activation of the 12/15-LOX pathway and its metabolites may represent a promising avenue in the development of new therapies for osteoarthritis.

Keywords : osteoarthritis, cartilage, 12/15-LOX, LXA4, 13-HODE, 15-HETE, MMP-13, ADAMTS5, iNOS, mPGES-1, C1, 2C, VDIPEN.

TABLES DES MATIÈRES

| | |
|---|-----|
| RÉSUMÉ | iii |
| ABSTRACT | v |
| TABLES DES MATIÈRES | vii |
| LISTE DES FIGURES | ix |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xi |
| REMERCIEMENTS | xiv |
| Introduction..... | 1 |
| 1.1 L'arthrose et le cartilage articulaire..... | 1 |
| 1.1.1 L'arthrose..... | 1 |
| 1.1.2 Les facteurs de risques | 3 |
| 1.1.3 Les traitements..... | 5 |
| 1.1.3.1 Les traitements non-pharmacologiques | 5 |
| 1.1.3.2 Les traitements pharmacologiques | 6 |
| 1.1.3.3 Les injections de corticostéroïdes et d'hyaluronane..... | 7 |
| 1.1.3.4 La chirurgie | 7 |
| 1.1.4 Les composantes de l'articulation..... | 8 |
| 1.1.4.1 Le cartilage articulaire | 9 |
| 1.1.4.2 La composition de la matrice extracellulaire (MEC)..... | 10 |
| 1.1.4.3 Les chondrocytes | 12 |
| 1.1.5 Physiopathologie de l'arthrose..... | 13 |
| 1.1.5.1 La structure du cartilage articulaire normal | 13 |
| 1.1.5.2 Description de l'articulation arthrosique..... | 15 |
| 1.2 Facteurs impliqués dans la pathogénèse de l'arthrose..... | 19 |
| 1.2.1 Les médiateurs cataboliques intervenant dans la dégradation du cartilage..... | 19 |
| 1.2.1.1 Protéases : les métalloprotéases (MMPs)..... | 19 |
| 1.2.1.2 Protéases : les ADAMTs..... | 22 |
| 1.2.2 Les médiateurs inflammatoires intervenant dans la dégradation du cartilage..... | 23 |
| 1.2.2.1 Cytokines : Interleukine-1 β et TNF- α | 23 |
| 1.2.2.2 Radicaux libres : l'oxyde nitrique (NO) | 25 |
| 1.2.2.3 Eicosanoïdes : Prostaglandine E (PGE2)..... | 26 |
| 1.3 La voie de lipoxgénases | 29 |

| | |
|---|----|
| 1.3.1 La 12/15-lipoxygénase (12/15-LOX)..... | 31 |
| 1.3.1.1 Expression et régulation..... | 31 |
| 1.3.1.2 Localisation et structure..... | 32 |
| 33 | |
| 1.3.2 Le rôle des métabolites de la 12/15-LOX..... | 34 |
| 1.3.3 Les propriétés anti-inflammatoires et protectrices de la 12/15-LOX..... | 35 |
| Article scientifique | 37 |
| Discussion..... | 74 |
| Conclusion et perspectives..... | 85 |
| Bibliographie..... | 87 |

LISTE DES FIGURES

Introduction et discussion

Figure 1 : L'évolution de l'arthrose. Différence entre l'articulation normale et arthrosique. 2

Figure 2 : Les principales composantes de l'articulation du genou. 9

Figure 3 : L'organisation structurelle et la composition des zones du cartilage articulaire... **Error!**

Bookmark not defined.

Figure 4 : Les mécanismes moléculaires et cellulaires durant la physiopathologie de l'arthrose. 17

Figure 5 : La biosynthèse des eicosanoïdes. 27

Figure 6 : Biosynthèse des eicosanoïdes : la voie des cyclooxygénases. 28

Figure 7 : Schéma de la voie des lipoxygénases. 31

Figure 8 : Localisation des gènes 15-LOX, incluant la 12/15-LOX sur le chromosome 17. 33

Figure 9 : Schéma montrant l'effet suppresseur des métabolites 15-HETE et 13-HODE de la 12/15-LOX via l'activation de la voie de PPAR γ sur l'expression des métalloprotéases. 83

Article

Figure 1 : Expression of 12/15-LOX during the progression of DMM-induced OA and aging in WT mice 65

Figure 2 : Deletion of 12/15-LOX accelerates cartilage erosion with age. 66

Figure 3 : Deficiency of 12/15-LOX exacerbates cartilage erosion after DMM surgery. 67

Figure 4 : Expression of MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 in the knee joints of WT and 12/15-LOX $^{-/-}$ mice at 3 and 6 months old 68

Figure 5 : Expression of MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 in the knee joints of 12/15-LOX $^{-/-}$ mice at 2 weeks post-DMM surgery 69

Figure 6 : 12/15-LOX metabolites prevent IL-1 α -induced inflammatory and catabolic responses
in cultured cartilage explants 70

Figure 7 : LXA4 attenuated DMM-induces cartilage destruction. 71

Suppl figure 8 : Expression of C1,2C and VDIPEN in the knee joints of WT and 12/15-LOX-/-
mice at 3 and 6 months old 72

Suppl figure 9 : Expression of C1,2C and VDIPEN in the knee joint of 12/15-LOX-/- mice at 2
weeks post-DMM surgery 73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------------|--|
| AA | Acide arachidonique |
| ACL | <i>Anterior cruciate ligament</i> |
| ADAMTs | A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs |
| AINS | Anti-inflammatoires non stéroïdiens |
| AP-1 | Activating protein-1 ou protéine activatrice-1 |
| AR ou RA | Arthrite Rhumatoïde |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| CA | Cartilage articulaire |
| CS | Chondroïtine sulfate |
| COX (1 ou 2) | Cyclo-oxygénase (1 ou 2) |
| COXibs | Inhibiteurs des COXs |
| DMM | Destabilization of the medial meniscus |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> |
| GAG | Glycosaminoglycane |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogénase |
| HETE | Acide hydroxyeicosatétraénoïque |
| HODE | Acide hydroxy-octadécadiénique |
| IGF-1 | Insulin-like-Growth Factor-1 |
| iNOS | <i>Inductible nitric oxide synthase</i> |
| IL | Interleukine |
| IL-1R α | Antagoniste du récepteur à l'IL-1 |
| KS | Kératane sulfate |

| | |
|----------------|---|
| LA | Acide linoléique |
| LIF | Leukemia Inhibitory Factor |
| LOX | Lipoxygenase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| L-PGDS | Lipocaline Prostaglandine D-synthase |
| LTA4 | Leucotriene A4 |
| LTB4 | Leucotriene B4 |
| LTC4 | Leucotriene C4 |
| LTD4 | Leucotriene D4 |
| LTE4 | Leucotriene E4 |
| LT | Leukotriene |
| LX | Lipoxines |
| LXA4 | Lipoxine A4 |
| MAP kinase | Mitogen-activated protein kinase |
| MEC | Matrice ExtraCellulaire |
| MMP | Métalloprotéase matricielle |
| MMTL | Medial meniscotibial ligament |
| mPGES-1 | Microsomal prostaglandine E synthase type 1 |
| m-RNA | Messenger RNA |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NOS | Nitric Oxide Synthase |
| OA | Ostéoarthrose |
| OARSI | Osteoarthritis Research Society International |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |

| | |
|---------------|---|
| PGD2 | Prostaglandine D2 |
| PGE2 | Prostaglandine E2 |
| PEA3 | Enhancer activator protein 3 |
| PGES | Prostaglandine E synthase |
| PGF2 | Prostaglandie F2 |
| PGG2 | Prostaglandine G2 |
| PGH2 | Prostaglandine H2 |
| PGI2 | Prostacycline |
| phGPx | Phospholipid-hydroxyperoxide glutathione peroxidase |
| PLA2 | Phospholipase 2 |
| PPAR γ | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma |
| ROS | Reactive oxygen species |
| TGF- β | Transforming Growth Factor β |
| TIMP | Tissus inhibitors of metalloproteinases |
| TNF- α | Tumor necrosis factor α |
| TXA2 | Thromboxane |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, dans un premier temps, toute l'Unité de recherche en arthrose (Ura) du centre de recherche du CHUM et plus particulièrement mon directeur, Dr Hassan Fahmi, de m'avoir accueillie, fait confiance et guidée tout au long de ma maîtrise.

Je remercie tous les membres du laboratoire, Hassan Afif, FZ, Yassine Ouahdi et Guadid de m'avoir accompagnée et encouragée durant ces deux années d'études. Un gros merci aux membres de laboratoire du Dre Johanne Martel-Pelletier, en particulier Frédéric Paré pour ses généreux conseils, son aide et pour tout ce que j'ai appris de lui.

Je dois aussi remercier mes parents et mon frère qui m'ont encouragée et m'ont aidée à persévérer dans ce travail de maîtrise. Sans votre présence auprès de moi, ce projet n'aurait pas été facile à effectuer.

Finalement, j'adresse mes remerciements aux IRSC d'avoir subventionné ce projet.

Introduction

1.1 L'arthrose et le cartilage articulaire

1.1.1 L'arthrose

Il y a de nombreuses maladies affectant une grande population et pour lesquelles il n'existe peu ou pas de traitements disponibles. L'une des maladies les plus répandues au Canada est l'arthrose. Elle est la forme la plus fréquente des troubles rhumatismaux tant chez les femmes que chez les hommes. Elle touche environ 40 % des hommes et 47 % des femmes [1]. La majorité des personnes âgées de 65 ans et chez environ 80% des personnes de 75 ans et plus sont touchées par la maladie [2].

L'ostéoarthrose (OA) est reconnue comme étant une maladie qui affecte les articulations et se caractérise principalement par la dégradation du cartilage articulaire. Il existe un phénomène secondaire qui participe également à la pathologie de la maladie : l'inflammation de la membrane synoviale. Pendant cette étape, il y a une ingestion des produits de dégradation du cartilage par les cellules synoviales, ce qui les pousse à produire des médiateurs cataboliques et inflammatoires, comme les protéases et les cytokines pro-inflammatoires, et qui se retrouvent dans le liquide synovial. Ces médiateurs activent les chondrocytes dans la couche superficielle du cartilage, ce qui entraîne la synthèse des métalloprotéinases et augmente la dégradation du cartilage [3].

Or, l'OA n'affecte pas seulement les deux tissus de l'articulation (le cartilage et la membrane synoviale), mais également l'articulation entière. Ceci inclut les ligaments croisés, la capsule et les muscles périarticulaires. Il peut même se produire un remodelage de l'os sous-chondral et une formation d'excroissances osseuses, appelés ostéophytes. En raison des relations

inter-composantes de l'articulation, il suffit que l'une de ces composantes soit atteinte pour que la pathologie de l'arthrose s'installe. L'évolution de l'arthrose est illustrée à la figure 1 en montrant la différence entre une articulation normale et arthrosique.

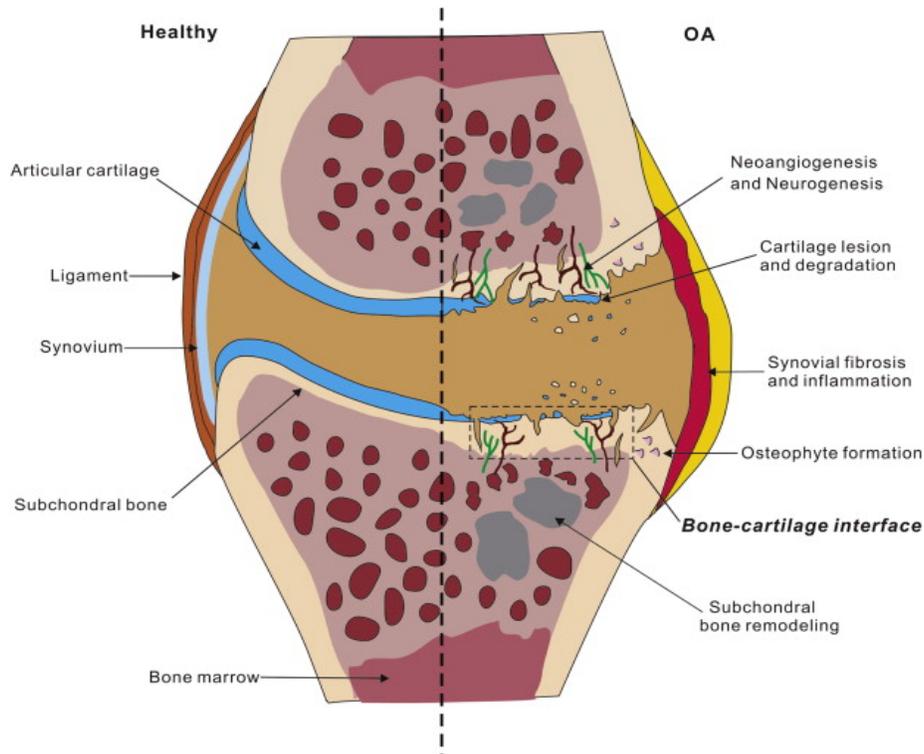


Figure 1 : L'évolution de l'arthrose. Différence entre l'articulation normale et arthrosique.

(Adapté de [4]).

L'OA est la principale raison des consultations en médecine générale. Les premiers symptômes rencontrés chez les patients atteints sont la douleur et le gonflement de l'articulation [2]. Dans le cas où l'arthrose n'est pas suivie et que la maladie évolue, il y a une diminution de la mobilité accompagnée d'une déformation de l'articulation. La radiologie du genou est effectuée par les cliniciens afin d'examiner l'état de l'articulation. Il peut toutefois y avoir une dissociation

radio-clinique, c'est-à-dire une absence de corrélation entre l'état radiologique et l'état clinique, d'où la complexité de la maladie.

L'OA peut toucher plusieurs articulations du corps, mais les plus affectées sont les genoux, les hanches, les mains, les rachis et le cou. Les autres articulations du corps le sont moins, comme le coude, la cheville, les épaules et le poignet [5].

L'OA est reconnue comme étant un processus du vieillissement normal et il n'y aurait aucun moyen de l'éviter ou de l'inverser; d'où le terme *maladie dégénérative de l'articulation associé à la pathologie*. Plusieurs études ont permis de mieux comprendre la pathophysiologie générale de l'arthrose mais, malgré toutes les recherches effectuées, le pathomécanisme de l'OA n'est pas encore totalement compris. À ce jour, les traitements sont de natures symptomatiques et ont seulement pour effet d'atténuer la douleur. Il n'existe aucun traitement efficace pour prévenir ou arrêter la progression de la pathologie une fois qu'elle est installée.

1.1.2 Les facteurs de risques

L'OA est une maladie complexe et semble être multifactorielle. Certains facteurs augmentant les risques de l'OA sont de natures systémiques. Parmi les facteurs prédisposant à l'OA, on retrouve l'âge et le sexe de l'individu. La prévalence de la maladie se retrouve plus chez les femmes que chez les hommes et augmente avec l'âge [6]. De plus, certaines études ont montré qu'un statut socioéconomique précaire augmente les risques de développer la maladie. Les antécédents familiaux et la génétique semblent également jouer un rôle dans le développement de l'OA. Enfin, l'alimentation peut avoir une incidence sur la progression de l'OA. Il semblerait que les personnes atteintes de l'arthrose disposant d'un faible apport en vitamine D montreraient une progression plus rapide des symptômes de la maladie. Cependant,

des essais cliniques ont montré que la supplémentation de vitamine D n'a aucun effet positif sur la perte du cartilage du genou. D'autres vitamines semblent être impliquées dans la protection contre la maladie, comme des niveaux élevés des vitamines C et K. De plus, les hormones, comme l'œstrogène, possèdent un effet protecteur et diminuent le risque de l'OA. Il s'avère que l'administration de cette hormone est associée à une diminution de 50 % [7] de la prévalence de l'OA de la hanche.

Il existe également d'autres facteurs locaux, comme l'obésité, qui sont en relation avec le développement de l'OA. Une masse corporelle excessive exerce une haute charge sur l'articulation portant ce poids (par exemple le genou et la hanche), ce qui mène à la détérioration et à la dégradation du cartilage articulaire [1]. D'ailleurs, il a été démontré que le tissu adipeux est impliqué dans la physiopathologie de l'arthrose en produisant des médiateurs comme la leptine, l'adiponectine, la visfatine et la résistine. En effet, une étude réalisée par *Dumond et coll*, a montré que la leptine est présente dans le liquide synovial des patients atteints d'OA et qu'elle est plus exprimée dans le cartilage arthrosique ainsi que dans les ostéophytes que dans le cartilage normal [8].

De plus, une autre étude a signalé que l'injection intra-articulaire de la leptine chez le rat induit la production des métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9), de la Cathepsine D et des agrécanases (ADAMTS-4 et 5), ce qui exacerbe la dégradation du cartilage [9]. Bref, ceci indique le rôle pro-inflammatoire et catabolique que la leptine peut exercer sur le métabolisme des chondrocytes. Or, il arrive que certaines personnes obèses développent des érosions au niveau des articulations non portantes, par exemple dans la main, les doigts et les poignets. Ceci suggère que la leptine présente dans le tissu adipeux puisse être fortement impliquée dans le

processus de l'OA, ce qui pourrait expliquer le développement de l'OA au niveau des articulations qui ne supportent pas de poids excessif.

D'autre part, les articulations des genoux, desquels les ménisques et les ligaments croisés ayant subi des lésions traumatiques, sont plus susceptibles de développer l'OA [10]. D'ailleurs, les lésions au genou causées par des blessures sportives augmentent les risques d'arthrose. Les analyses radiographiques établies à la suite de certaines études ont démontré que 41 % à 51 % des personnes blessées aux genoux risquent la gonarthrose [11].

1.1.3 Les traitements

Jusqu'à présent, il n'existe aucun traitement efficace pour traiter l'OA. Cependant, les traitements pharmacologiques et non-pharmacologiques existants ciblent le soulagement général des douleurs provoquées par la maladie et améliorent la qualité de vie des patients. De plus, dépendamment de la sévérité de la maladie, ces traitements peuvent être prescrits par les cliniciens.

1.1.3.1 Les traitements non-pharmacologiques

Les traitements disponibles ont seulement pour effet d'atténuer la douleur provoquée par la maladie, mais n'affectent pas la progression ou l'arrêt complet de la pathologie. Le rôle des traitements non-pharmacologiques est d'améliorer la mobilité, la capacité fonctionnelle et la qualité de vie du patient [12]. De plus, il existe des traitements non-pharmacologiques qui permettent aux patients de maintenir une bonne musculature. Par ailleurs, les personnes en surpoids risquent de développer l'arthrose au cours de leur vie, puisqu'il y a une surcharge élevée du poids sur l'articulation portante. La perte de poids est donc considérée comme une prévention primaire de l'arthrose.

À la suite de certaines études effectuées auprès de patients atteints par l'OA, il est recommandé d'effectuer des exercices d'aérobic, aquatique ou de résistance et d'avoir une bonne diète afin de perdre les kilos en trop chez les personnes en surpoids [13].

1.1.3.2 Les traitements pharmacologiques

Certains patients ont recours aux traitements pharmacologiques. Ces traitements sont prescrits afin de les soulager des douleurs et de l'inflammation due à l'arthrose, et peuvent même être administrés en combinaison. Cependant, leur prescription dépend de la gravité de la maladie. Pour l'arthrose du genou, les études cliniques recommandent l'administration d'analgésiques tel que le Paracétamol (acétaminophène) comme premier traitement oral analgésique [14]. Or, les patients ne répondant pas au Paracétamol et montrant des symptômes d'inflammation, comme une douleur nocturne, une raideur matinale, un gonflement articulaire ainsi qu'une synovite, peuvent se voir recommander, après un examen arthroscopique, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) [14]. Le mode d'action des AINS consiste à bloquer la biosynthèse des acteurs de l'inflammation dont les prostanoïdes et les thromboxanes par la voie des cyclo-oxygénases (COXs) [15].

Les AINS peuvent être des inhibiteurs non sélectifs des cyclooxygénases (COX), incluant la COX-1 et la COX-2, comme l'ibuprofène, le naproxène et le diclofénac. Ces AINS peuvent induire des effets secondaires comme des diarrhées, des problèmes gastriques et des douleurs abdominales.

Les AINS peuvent également être des inhibiteurs sélectifs de la COX-1 (Aspirine) ou de la COX-2, communément appelés COXib (Vioxx et Celebrex), et qui montrent moins d'effets secondaires comparativement à l'inhibiteur sélectif de la COX-1. Cependant, des études ont montré que les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 interagissent avec le système gastro-intestinal,

bien qu'ils soient mieux tolérés que les inhibiteurs de la COX-1. Les COXib font également interaction avec le système rénale et cardiovasculaire. En effet, ils peuvent affecter le taux de filtration glomérulaire chez les patients à risque. Ils provoquent également un œdème périphérique ainsi qu'une hypertension [16].

1.1.3.3 Les injections de corticostéroïdes et d'hyaluronane

D'autre part, pour les patients qui n'ont pas répondu adéquatement aux premières thérapies, on recommande des injections intra-articulaires de corticostéroïdes et d'hyaluronane afin de soulager, à court terme, les douleurs et les enflures. Par ailleurs, une étude réalisée par *Yoshioka et al.* a démontré que l'injection de l'hyaluronane possède des effets protecteurs sur le cartilage articulaire et joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'articulation. Dans cette étude, il est montré que le traitement à l'hyaluronane inhibe la relâche des chaînes de glycosaminoglycane (GAG) liées aux agrécans dans le cartilage articulaire, ce qui permet de maintenir la rigidité du cartilage et ralentir sa dégradation [17].

1.1.3.4 La chirurgie

Certains patients ne répondent pas aux traitements pharmacologiques en raison de douleurs excessives provoquées par l'état dégradé du cartilage articulaire. Pour ces personnes, les études cliniques montrent que le remplacement total de l'articulation (arthroplastie) par une prothèse s'avère être un bon traitement. Ce type d'intervention chirurgicale est utilisée en dernier recours chez les patients ayant été traités avec une combinaison de traitements pharmacologiques non efficaces. Par ailleurs, des analgésiques opioïdes sont recommandés aux patients pour qui une arthroplastie articulaire est contre-indiquée et pour qui les autres traitements médicaux ont échoué [18].

En résumé, comme mentionné plus haut, ces traitements atténuent surtout les symptômes de l'OA, mais n'ont aucun impact sur la prévention et la guérison de la maladie. Ils ne permettent pas de freiner la cause principale de la maladie : la dégradation du cartilage.

1.1.4 Les composantes de l'articulation

Les articulations permettent la mobilité du squelette du corps humain et forment la jonction entre les os. L'articulation du genou assure son mouvement. Il est facilité par le glissement des os l'un par rapport à l'autre et par la participation des autres composantes de l'articulation : les muscles, les ligaments, le tendon et les nerfs [19]. Le liquide synovial sécrété par la membrane synoviale assure la nutrition et contribue également au mouvement en assurant la lubrification de l'articulation. Sa composition est principalement d'eau, de sels minéraux, des protéines et de l'acide hyaluronique (longue chaîne d'un polymère de disaccharide). Celui-ci est responsable de la viscosité du liquide synovial. En effet, le rôle lubrifiant du liquide synovial s'explique par sa nature visqueuse [20]. L'articulation du genou comprend les os tibial et fémoral recouverts par le cartilage articulaire afin de rendre le mouvement plus simple et d'éviter tout frottement direct entre les os. D'autres constituants de l'articulation comme, par exemple, le ménisque, la capsule et la membrane synoviale (qui est composée des fibroblastes et des macrophages) sont aussi impliqués afin d'augmenter la stabilité et de faciliter le glissement, assurant ainsi la trophicité de l'articulation et la phagocytose (figure 2).

L'articulation comprend également l'os sous-chondral composé de tissu osseux d'une épaisseur de 1-2 mm et qui constitue une zone de transition entre le cartilage et l'os. Il contribue avec le cartilage et le liquide synovial à l'amortissement des chocs. De plus, l'os sous-chondral assure les échanges de nutriments grâce à la vascularisation entre l'os et le cartilage. C'est ainsi que le

cartilage est nourri. Cependant, le cartilage est la composante la plus importante dans le sujet de l'arthrose.

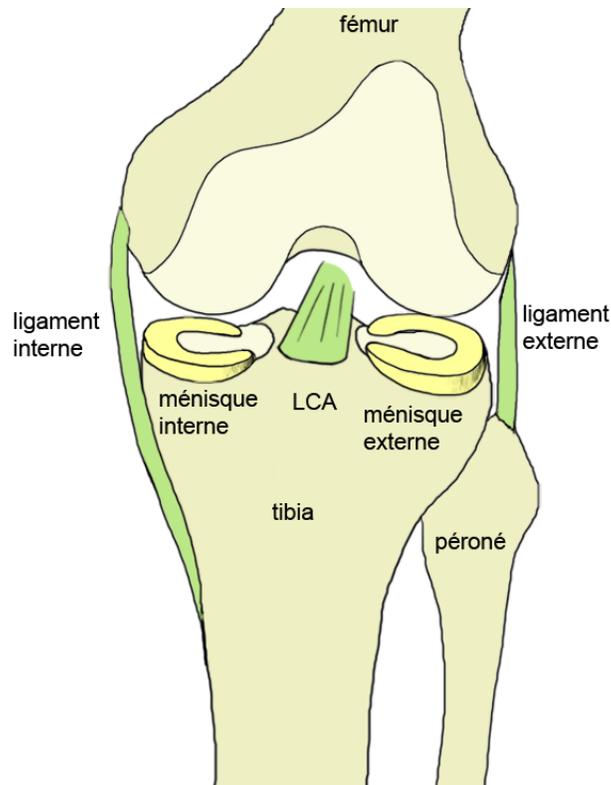


Figure 2 : Les principaux composants de l'articulation du genou.

http://chirurgiedusport.com/images/anatomie_genou_gauche_lca_menisque_ligament_croise_antérieur.png

1.1.4.1 Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif avasculaire et non innervé, d'origine mésenchymateuse [3]. Il assure deux principales fonctions : le glissement des os ainsi que l'amortissement, et ce grâce à son élasticité et à sa résistance aux forces de compression [21]. Le cartilage est constitué d'un seul type cellulaire nommé *chondrocytes* qui sont enchâssées dans une matrice extracellulaire (MEC) et se nourrissent à partir du liquide synovial. Le cartilage articulaire comprend trois principales composantes de la MEC : le collagène, les protéoglycanes

et les chondrocytes. Grâce à ces différents éléments, le cartilage possède une structure organisée comprenant différentes zones qui diffèrent entre elles selon l'orientation des fibres de collagène, la quantité des prostaglandines, de l'eau ainsi que la forme des chondrocytes (voir figure 3).

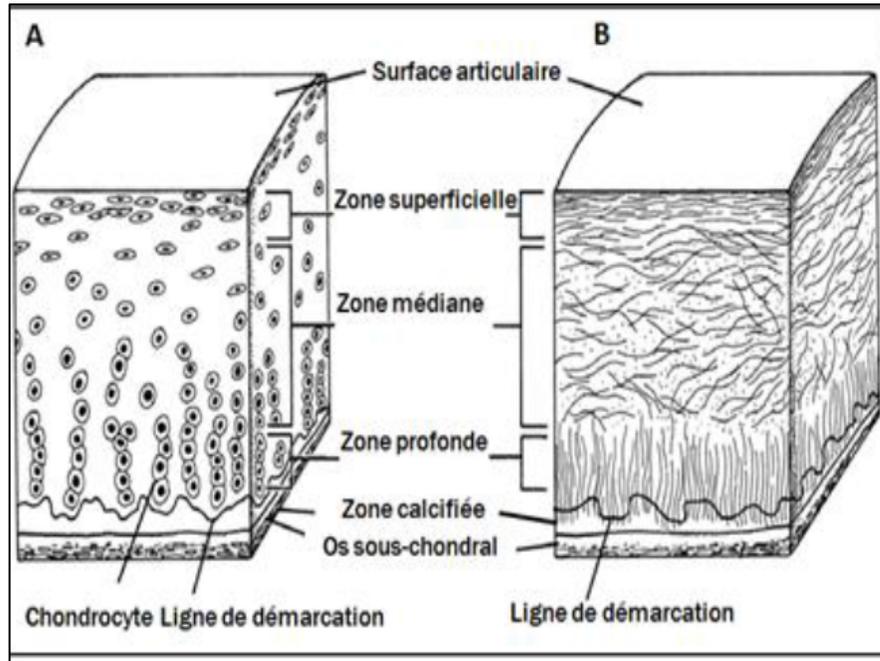


Figure 3 : L'organisation structurelle et la composition des zones du cartilage articulaire. (Adapté de [22]).

1.1.4.2 La composition de la matrice extracellulaire (MEC)

L'homéostasie de l'environnement des cellules et la structure du cartilage articulaire sont maintenues par la matrice extracellulaire [23]. Celle-ci est principalement composée d'un réseau de collagène de type II, occupant environ 50 % du poids sec du cartilage articulaire [6] qui a pour fonction d'assurer la rigidité du cartilage. La MEC comprend une proportion d'eau allant de 60 à 80 % et les molécules de protéoglycanes réparties dans ce réseau de collagène assurent l'hydratation du cartilage. D'ailleurs, les protéoglycanes sont des molécules chargées

négativement, permettant des liaisons ioniques avec les molécules d'eau environnantes afin d'assurer l'élasticité du cartilage [24].

Bien que ce soit le collagène de type II qui est la composante principale du cartilage, il existe également d'autres protéines collagéniques qui le constituent : les collagènes de types VI, X, IX et XI.

L'assemblage des molécules de collagène de type II crée un réseau fibrillaire de forme tridimensionnelle, conférant au cartilage sa résistance aux pressions, tout en assurant sa rigidité [25]. De plus, ce réseau formé s'avère être essentiel dans le maintien de la forme et du volume du cartilage [26].

Le collagène de type VI se situe plutôt dans l'espace péricellulaire du chondrocyte et n'a aucune interaction directe avec le réseau fibrillaire du collagène de type II. Il peut toutefois être important dans l'adhésion des chondrocytes à la matrice [26].

En ce qui concerne le collagène X, son expression est plutôt localisée dans la zone d'hypertrophie tardive des cartilages de croissance, et se retrouve proche des chondrocytes situés dans la zone minéralisée du cartilage. Lors de la minéralisation de la matrice extracellulaire, ce type de collagène s'avère être impliqué dans ce type de processus [27].

Le collagène de type IX, quant à lui, est lié par des interactions covalentes aux fibrilles de collagène de type II, et confère une certaine stabilité au réseau du collagène dans le cartilage [26].

Enfin, le collagène de type XI occupe 2 à 3 % de la totalité du collagène. Il se présente sous forme fibrillaire hétérotrimérique et se retrouve dans les fibrilles de collagène II afin de contrôler leur intégrité et leur structure [26].

Les protéoglycanes se retrouvent dans la matrice extracellulaire du cartilage articulaire et assurent l'élasticité du cartilage grâce à leur forte teneur en eau. Les macroprotéoglycanes de type agrégane comptent pour 90 % des protéoglycanes du cartilage [25]. Ils présentent une masse importante et ont pour fonction d'assurer la rigidité du cartilage. On les retrouve dans les réseaux de fibres de collagène II en raison de leur masse élevée.

Les agréganes de haut poids moléculaire ont une structure protéique axiale sur laquelle plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG), comme le chondroïtine sulfate (CS) et le kératane sulfate (KS), sont liées de façon covalente. Elles possèdent également une molécule d'acide hyaluronique qui est liée de façon non covalente. Elles assurent la lubrification et la viscoélasticité du cartilage [21]. Le cartilage demeure hydraté grâce aux propriétés biophysiques des GAG.

Les agréganes de plus petites masses moléculaires, comme la décorine, le biglycane et la fibromoduline, diffèrent des agréganes de plus grande masse par la quantité des GAG liés à la protéine axiale des protéoglycanes. Ces petits protéoglycanes riches en leucines se retrouvent principalement à la surface articulaire et ont le pouvoir de lier les collagènes II [28].

1.1.4.3 Les chondrocytes

Le cartilage articulaire est composé d'un seul type cellulaire nommé *chondrocytes*. Ce sont des cellules métaboliquement très actives, responsables du maintien de l'homéostasie du cartilage; c'est-à-dire, de la synthèse et de la dégradation des composantes (collagène, protéoglycanes et glycoprotéines) de la matrice extracellulaire. Elles sont également impliquées dans la synthèse de divers enzymes tels que les métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMPs), ainsi que plusieurs médiateurs inflammatoires. Les chondrocytes dérivent des cellules mésenchymateuses et ne représentent que 1 à 5 % de la masse totale du cartilage [29]. Comme

toutes les autres cellules, les chondrocytes contiennent un noyau bien développé, des vacuoles lysosomiales, un appareil de Golgi ainsi qu'un réticulum endoplasmique. Elles détiennent cependant un faible nombre de mitochondries, ce qui leur permet de bien fonctionner dans un environnement anaérobie en absence d'oxygène [30]. Par ailleurs, la diffusion de leurs nutriments et métabolites se fait à travers la surface articulaire [29].

Normalement, les chondrocytes sont quiescentes et ne prolifèrent pas [31]. Avec le vieillissement, elles perdent leur capacité de se régénérer, leur densité diminue, et la synthèse de la matrice extracellulaire diminue. D'ailleurs, des études ont montré une dégradation de la partie superficielle de la matrice extracellulaire chez des adultes âgées entre 28 et 82 ans [32].

1.1.5 Physiopathologie de l'arthrose

1.1.5.1 La structure du cartilage articulaire normal

Le cartilage articulaire normal comprend une surface lisse, brillante et blanche de nature translucide qu'on appelle *cartilage hyalin* [26]. L'épaisseur moyenne d'un cartilage articulaire normal est d'environ de 2,4 mm [33]. Son organisation structurelle est constituée de quatre zones : la zone superficielle, la zone moyenn, la zone profonde et la zone calcifiée qui est localisée directement après une ligne basophile qui démarque la zone calcifiée de la zone profonde : la *tidemark* [34]. Leur existence est due aux changements morphologiques des chondrocytes et de la matrice extracellulaire, allant de la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondrale [27].

1. La zone superficielle se retrouve sur la surface du cartilage articulaire faisant face à la cavité synoviale. Elle représente 10 à 20 % de l'épaisseur totale du cartilage articulaire [22]. Les fibrilles de collagène de cette zone sont très fines [35], hautement condensées et orientées parallèlement à la surface articulaire. La disposition des fibrilles détermine les

propriétés du tissu et peut affecter les mouvements de certaines molécules qui passent à travers le cartilage. Elles assurent une résistance aux forces de cisaillement et de tensions [27]. Cependant, la zone superficielle est moins dense en protéoglycanes et se caractérise par une faible perméabilité aux fluides [36]. Des expériences *in vitro* ont montré que cette zone du cartilage est fortement impliquée dans la structure du cartilage articulaire. Sa suppression augmente la perméabilité du tissu, ce qui améliore le passage des macromolécules. La perturbation de cette zone est le premier changement structural détecté lors de la dégénérescence du cartilage articulaire. Ceci suggère que son altération contribue au développement de l'OA. Par ailleurs, les cellules dans chacune des zones diffèrent entre elles par leur taille, leur allure et leur orientation par rapport à la surface articulaire. Dans cette même zone, les chondrocytes sont aplatis et orientés parallèlement à la surface. Leur activité métabolique est différente puisqu'elles dégradent rapidement les protéoglycanes et synthétisent le collagène plus lentement, ce qui explique pourquoi les proportions de ces deux composantes de la matrice sont différentes. On y retrouve également de l'eau et de la fibronectine en grande quantité [27].

2. La zone mitoyenne est sous la zone superficielle. Ici, les chondrocytes ont un aspect plus arrondi et sont alignés de manière perpendiculaire à la surface articulaire [27]. Cette zone correspond à 40 à 60 % de l'épaisseur du cartilage articulaire [22]. Les fibrilles de collagène de la zone mitoyenne sont de diamètre plus large et sont orientés de manière aléatoire. La matrice est riche en protéoglycanes à faible concentration en eau [27].

3. La zone profonde correspond à 30 à 40 % de l'épaisseur totale [22]. Comme dans la zone mitoyenne, les fibrilles de collagène sont de diamètre plus large et sont orientés perpendiculairement à la surface. Cependant, cette zone contient une plus faible concentration de protéoglycanes et d'eau, comparativement à la zone mitoyenne [36]. Il est intéressant de noter que la densité des chondrocytes diminuent de zone en zone, ce qui fait qu'ils sont allongés et disposés en colonnes les unes par-dessus les autres, et en plus faible concentration [22],[26].

4. La zone calcifiée occupe 5 à 10 % de la totalité du cartilage [26]. C'est une fine zone du cartilage calcifié qui sépare la zone non calcifiée de l'os sous-chondral. On y retrouve des chondrocytes moins volumineux que ceux de la zone mitoyenne, et elle possède moins de réticulum endoplasmique et de Golgi. Apparemment, les cellules qui baignent dans cette zone sont métaboliquement moins actives [27]. Par ailleurs, le collagène de type II est remplacé par le collagène de type X étant donné que la matrice extracellulaire de cette zone est minéralisée [22].

1.1.5.2 Description de l'articulation arthrosique

Comme mentionné plutôt, l'OA est une pathologie qui se caractérise par la dégradation du cartilage, suivie d'une inflammation de la membrane synoviale et d'un remodelage de l'os sous-chondral, ainsi que d'une formation des ostéophytes (figure 1) [27]. Elle est considérée comme une maladie qui se développe avec l'âge suite aux chocs traumatiques. Il existe différents mécanismes impliqués dans l'initiation de l'OA, comme les facteurs biochimique, génétique et

mécanique [37]. Ce dernier facteur est considéré comme étant le mécanisme initiateur le plus commun dans le développement de l'OA. En condition physiologique, les chondrocytes du cartilage articulaire sont métaboliquement quiescents [25] et maintiennent l'homéostasie du cartilage en y créant une forme d'équilibre de la synthèse (anabolisme) et de la dégradation (catabolisme) des composantes de la matrice extracellulaire. Leur activité anabolique inclut la production des protéines de la MEC comme les collagènes, les protéoglycanes, les inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMPs), certains facteurs de croissances TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), IGF-1 (*Insulin-like-Growth Factor 1*) et BMP (*Bone Morphogenetic Protein*). En parallèle, les chondrocytes participent à des activités cataboliques qui incluent la production de certaines cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α [31], les protéases, les prostaglandines ainsi que les radicaux libres. La pathophysiologie de l'arthrose débute lorsque l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme est rompu. Autrement dit, les chondrocytes acquièrent un phénotype procatabolique qui leur permet d'augmenter leur production en facteurs cataboliques favorisant la dégradation du cartilage (figure 4). Les cellules produisent donc plus d'enzymes protéolytiques comme les métalloprotéinases (MMPs) et les aggrécánases, plus de facteurs pro-inflammatoires, incluant les prostaglandines E2 (PGE₂), l'oxyde nitrique (NO) ainsi que des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α . Ces facteurs inflammatoires augmentent aussi la synthèse des protéinases qui dégradent la matrice extracellulaire (figure 4) [25].

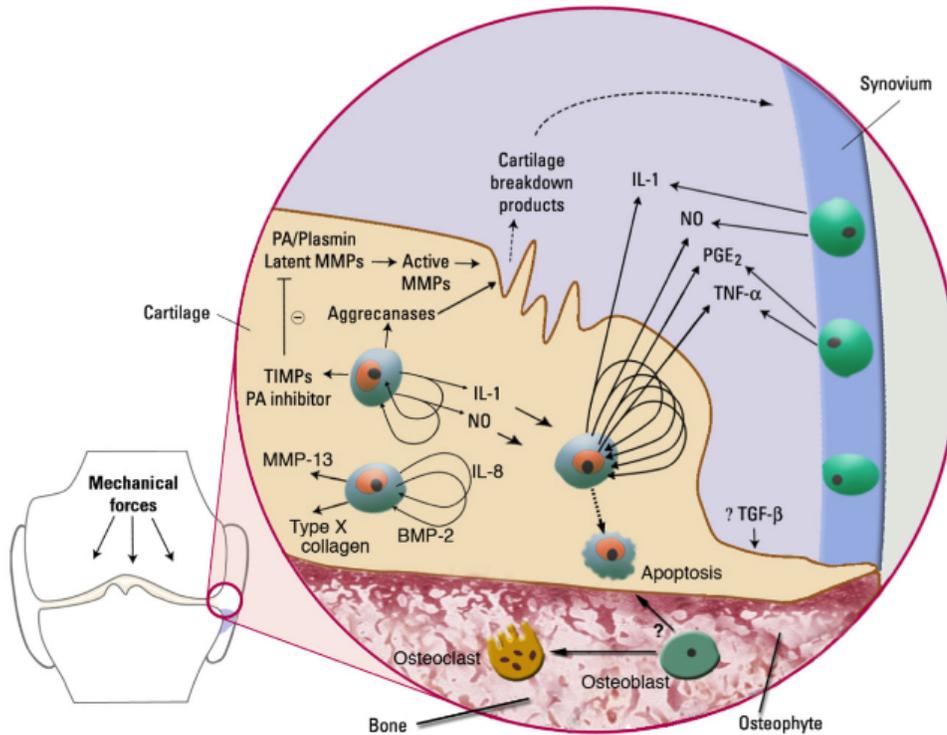


Figure 4 : Les mécanismes moléculaires et cellulaires durant la physiopathologie de l'arthrose.

https://classconnection.s3.amazonaws.com/737/flashcards/1944737/png/chondrocyte_changes-142915BF3A0429FDB01.png

Ensuite, les chondrocytes s'hypertrophient en exprimant le collagène X et des facteurs pro-angiogéniques (VEGF) qui ne sont pas exprimés dans un cartilage normal. La présence de collagène X en grande quantité reflète la calcification des couches plus profondes du cartilage, alors que le VEGF induit l'expression de certaines métalloprotéinases (MMP-1 et MMP-13) qui exacerbent la dégradation du cartilage. En parallèle, leur activité de synthèse des composantes de la matrice extracellulaire, comme le collagène de type II et l'aggrécane, est plutôt réduite [21].

Des études ont montré que les protéines sous forme mature BMP-7, normalement produites par les chondrocytes en conditions anaboliques et qui ont pour fonction de stimuler la synthèse de la matrice extracellulaire, se retrouvent réduite en conditions pathologique. Cette protéine se retrouve effectivement sous une forme mature et active (BMP-7) et sous une forme

inactive Pro-BMP-7. Ces études ont montré que la forme active est régulée à la baisse lorsque la forme inactive est à la hausse durant l'OA [31]. Ceci démontre que les chondrocytes contribuent majoritairement dans la pathologie de l'OA et que la dégradation du tissu est due à la production excessive des protéinases par les cellules en réponse aux stimuli inflammatoires. Ce déséquilibre est généralement provoqué par un stress mécanique ou par un stress inflammatoire altérant progressivement la matrice extracellulaire du cartilage; elle conduit à la dégradation du cartilage articulaire.

La dégradation du cartilage se caractérise par l'apparition de la fibrillation à la surface du cartilage articulaire puisque les fibrilles de collagènes sont endommagées. Ensuite, une perte des protéoglycanes se manifeste en incluant les décorines, le biglycane et l'aggrécane et ce, allant de la matrice superficielle jusqu'en profondeur du cartilage [28]. Durant l'OA, il y a une forte dénaturation du collagène II. Elle est due à une forte expression de la collagénase, l'enzyme responsable de la dégradation du collagène II. En premier, la surface articulaire perd son contenu en collagène II. Cette perte se manifeste ensuite progressivement dans la zone mitoyenne du cartilage pour finalement affecter la zone profonde [38]. Des études réalisées par Säämänen et al, et Hu et al, ont montré que des souris déficientes du gène responsable du Coll II et Coll IX développent spontanément l'OA [39], [40].

Les chondrocytes ne sont pas les seuls à participer à la dégradation du cartilage. Les produits de dégradation du cartilage se retrouvent dans la cavité synoviale et entrent en contact avec la membrane synoviale. Cette membrane réagit à ces fragments causés par la dégradation en produisant des médiateurs inflammatoires, des collagénases et d'autres enzymes hydrolytiques qui se retrouvent dans le liquide synovial. Une infiltration des cellules inflammatoires se produit

par la suite. Ainsi, l'inflammation synoviale s'installe et participe à l'exacerbation de la dégradation du cartilage [41]. Durant la progression de l'OA, le cartilage disparaît graduellement jusqu'à l'apparition de l'os sous-chondral. Dans les cas extrêmes, les excroissances osseuses prennent place et forment des ostéophytes calcifiés. Aux stades finaux de la pathologie, on constate un affaiblissement des structures supportant l'articulation causé par la perte de la trophicité musculaire, une calcification et une fibrillation des ménisques, ainsi que certaines modifications des ligaments croisés [26].

1.2 Facteurs impliqués dans la pathogénèse de l'arthrose

Comme mentionné précédemment, l'équilibre entre le catabolisme et l'anabolisme est rompu en faveur du catabolisme par les facteurs impliqués dans la pathogénèse de l'arthrose. Lors de l'OA, les chondrocytes et les synoviocytes produisent des médiateurs cataboliques ainsi que des médiateurs inflammatoires qui sont impliqués dans la résorption du cartilage [42].

1.2.1 Les médiateurs cataboliques intervenant dans la dégradation du cartilage

1.2.1.1 Protéases : les métalloprotéases (MMPs)

Il existe différents types de protéases fortement impliqués dans le développement de l'OA. La dégradation de la matrice extracellulaire se produit à cause de quatre classes d'enzymes protéolytiques, incluant les protéases à cystéine et à sérine, et les métalloprotéinases [25]. Or, durant la pathologie, les métalloprotéinases semblent jouer un rôle prédominant dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Parmi la famille des métalloprotéinases, il y a également les stromélysine (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) qui dégrade les protéoglycanes de la matrice extracellulaire, et jouent aussi un rôle important dans la pathogénèse de l'OA. Les métalloprotéinases comportent deux familles : les collagénases et les aggrécánases. Les

collagénases (MMPs) dégradent la matrice extracellulaire et leurs produits de dégradation se retrouvent au niveau du cartilage articulaire et du liquide synovial [21]. Il existe 27 différents types de MMPs, ayant chacun des propriétés particulières. Toutefois, seulement quatre types de MMPs sont comptés parmi les plus classiques : MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MMP-14.

- a) La MMP-1 (collagénase 1) est plutôt retrouvée chez un moins grand nombre de patients et possède une affinité pour le collagène nouvellement synthétisé [28], spécifiquement le Coll III [25]. Cette collagénase est produite par les cellules synoviales [25].
- b) La MMP-13 (collagénase-3) est l'enzyme la plus active et joue un rôle crucial dans la pathogénèse de l'OA [28]. Elle possède une spécificité autant pour le collagène II que pour l'aggrécane [25]. Une étude chez la souris a montré que la surexpression de la MMP-13 accélère le développement de l'OA [43]. En revanche, la délétion du gène de la MMP-13 confère la résistance et la protection contre le développement de l'OA [44]. Ces résultats indiquent le rôle fonctionnel de la MMP-13 dans l'OA.

L'activité des MMPs est régulée par des activateurs physiologiques comme la cathepsine B ainsi que des inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) [29]. Il est vrai que, par des expériences *in vivo* et en culture, on peut quantifier la réduction de la dégradation du collagène en inhibant les MMPs. Toutefois, l'inhibition des MMPs par les TIMPs comprend plusieurs complications altérant la fonctionnalité de la cellule, comme l'augmentation de la croissance cellulaire et l'invasion, la diminution de l'angiogenèse et l'augmentation de l'apoptose. Outre les TIMPs, on développe actuellement des molécules de petite taille destinées à inhiber l'effet protéolytique des enzymes actifs des MMPs en bloquant l'activation des proenzymes. Parmi ces

molécules, on retrouve les composés peptidomimétiques qui possèdent un groupement fonctionnel ayant la capacité de chélater l'atome de zinc dans le site actif de la protéine. D'autre part, il s'avère que des inhibiteurs, comme les composés non-peptidomimétiques, sont développés pour bloquer les MMPs; ils possèdent une meilleure biodisponibilité et une meilleure pharmacocinétique.

Il existe également les tétracyclines ayant la capacité de chélater le zinc pour bloquer l'activité enzymatique, pour prévenir l'activation protéolytique des proMMPs ainsi que pour limiter l'expression des gènes codant des MMPs. Le doxycycline hyclate est une des tétracyclines acceptées en clinique. Par contre, son administration est limitée aux maladies parodontales.

Les MMPs peuvent également être inhibés par les glucocorticoïdes en bloquant l'expression des gènes codant des MMPs. Or, les promoteurs des MMPs possèdent une similarité dans leur structure. Ceci peut entraîner un manque de spécificité par ces inhibiteurs envers les MMPs. Cependant, dans le but d'inhiber les MMPs, l'administration chronique des corticostéroïdes entraîne l'apparition de plusieurs effets secondaires. Il n'existe peu ou pas d'inhibiteurs des MMPs ayant des effets cliniques positifs malgré tous les efforts déployés pour créer des inhibiteurs des MMPs efficaces qui permettraient de bloquer l'action destructive du cartilage durant l'OA [25] et ce, à cause du manque de spécificité des inhibiteurs, parce que les métalloprotéinases possèdent tous des sites actifs qui se ressemblent structurellement. Ceci rend difficile de concevoir un inhibiteur assez spécifique pour une MMP en particulier.

1.2.1.2 Protéases : les ADAMTs

La deuxième famille des MMPs comprend les aggrecanases (ADAMTS). Elles correspondent à des métalloprotéinases ayant des motifs de thrombospondine [45] et sont responsables de la dégradation des protéoglycanes retrouvés dans le liquide synovial d'une articulation arthrosique. Plusieurs ADAMTS ont été étudiés et ce sont les ADAMTS-4 (aggrecanase-1) et ADAMTS-5 (aggrecanase-2) qui sont les plus impliqués dans la dégradation de l'aggrecane durant la pathogénèse de l'OA [46]. L'ADAMTS-5 est l'aggrecanase le plus retrouvé dans le cartilage des souris. Par ailleurs, leurs activités sont augmentées par la présence des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 [47]. Des études ont montré que les deux aggrecanases sont retrouvés majoritairement dans le cartilage articulaire suivant la stimulation des chondrocytes par l'IL-1 et le TNF- α . Toutefois, seul l'ADAMTS-5 a été détecté dans les échantillons de cartilage témoin; l'ADAMTS-4 en était absent. Ces résultats démontrent l'expression constitutive de l'ADAMTS-5 dans le cartilage articulaire [48]. D'autres études effectuées par Bondeson et al. ont permis de montrer le rôle important de l'ADAMTS-5 dans la perte de l'aggrecane et dans la destruction du cartilage articulaire en utilisant des modèles de souris déficientes du gène de l'ADAMTS-4 et ayant subi une chirurgie par déstabilisation qui induit l'OA. Les résultats montrent qu'il n'y a aucun effet protecteur chez ces souris comparativement aux souris sauvages [45]. On retrouve cependant, chez les souris déficientes de l'ADAMTS-5, les effets protecteurs contre la destruction du cartilage et le développement de l'OA [47].

Comme les collagénases, les aggrecanases sont une importante cible thérapeutique. Il s'avère que le TIMP-3 est un inhibiteur potentiel des ADAMTS-4 et ADAMTS-5. Il a été montré

que l'augmentation des niveaux de TIMP-3 dans le cartilage mène à des effets bénéfiques et protège le cartilage contre la dégradation [23].

1.2.2 Les médiateurs inflammatoires intervenant dans la dégradation du cartilage

1.2.2.1 Cytokines : Interleukine-1 β et TNF- α

Certaines cytokines pro-inflammatoires sont fortement impliquées dans la progression de l'OA. Les cytokines jouant un rôle majeur dans la destruction du cartilage articulaire sont l'IL-1 β et le TNF- α [29]. Au cours de l'arthrose, la destruction du cartilage induite par les protéases activées mène au relâchement de fragments de la matrice extracellulaire dans le liquide synovial. Ces fragments activent les synoviocytes, ce qui augmente leur expression en cytokines pro-inflammatoires IL-1, TNF- α , IL-17 et IL-18 qui diffusent dans le liquide synovial et passent à travers le cartilage afin d'exacerber sa dégradation [49]. En revanche, il se produit une diminution de la production de cytokines anti-inflammatoires qui stimulent la synthèse de la matrice extracellulaire, comme l'IGF-1, TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, les facteurs de croissances des fibroblastes FGFs 2, FGFs 4, FGFs 8, et les BMPs [31]. L'IL-1 et le TNF- α sont les cytokines les plus générées par les chondrocytes des patients atteints de l'OA [28]. Plus précisément, les niveaux d'IL-1 β et du TNF- α sont très élevés dans la membrane et le liquide synoviaux du cartilage ainsi que dans l'os sous-chondral des patients [50].

Ces cytokines ont la capacité de stimuler l'expression des métalloprotéinases comme la matrilysine (MMP-7) qui dégrade les protéoglycanes de la MEC ainsi que les MMP-1, MMP-3, MMP-9 et MMP-13 [25]. Elles sont également impliquées dans l'inhibition de la synthèse des inhibiteurs des métalloprotéinases. Elles inhibent la synthèse du collagène et des protéoglycanes

matricielles en augmentant l'activité de ces métalloprotéinases [37],[47]. Plus précisément, l'IL-1 β atténue l'expression du collagène II et de l'aggrécane, alors que le TNF- α réduit la synthèse de la protéoglycane, des protéines de jonctions et du collagène II dans les chondrocytes [50].

L'IL-1 β et le TNF- α stimulent leur propre production et induisent les chondrocytes et les cellules de la membrane synoviales à produire d'autres cytokines comme l'IL-8, l'IL-6 et le facteur inhibiteur de leucocytes (LIF) [51]. De plus, ces deux cytokines induisent la synthèse de l'enzyme responsable de la production de l'acide nitrique (iNOS), ainsi que celle de la COX-2 et de la prostaglandine E synthase-1 microsomale (mPGES-1) [52], et favorisant la production du facteur nucléaire (NF- $\kappa\beta$) [29].

Par ailleurs, certaines études montrent l'implication de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 α dans la pathogénèse de l'OA par l'induction des aggrécanasés ADAMTS-4 et ADAMTS-5 dans les explants de cartilage de souris [46].

D'autre part, le liquide synovial des patients atteints d'OA peut également contenir un nombre élevé des cytokines anti-inflammatoires, incluant l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13. Leurs mécanismes d'action consistent à diminuer la production de l'IL-1 β , du TNF- α et des MMPs [51]. Elles régulent à la hausse le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra) qui est en compétition avec les deux récepteurs de l'IL-1 soit l'IL-1R1 et l'IL-1R2, bloquant ainsi leur interaction avec l'IL-1 β et l'IL-1 α et régulant à la baisse leur activité pro-inflammatoire [52]. En plus de leur actions anti-inflammatoires, ces cytokines augmentent la production de l'inhibiteur tissulaire des MMP-1 (TIMP-1) et inhibent la production de la prostaglandine E2 (PGE2) [51].

1.2.2.2 Radicaux libres : l'oxyde nitrique (NO)

Comme mentionné précédemment, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α induisent la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces dernières provoquent des processus biologiques durant l'OA en contribuant principalement à la dégradation du cartilage articulaire. Les ROS, incluant NO et l'anion superoxide (O₂⁻), génèrent le peroxyde d'hydrogène, le peroxynitrite (ONOO-) et les radicaux hydroxyles qui, à leur tour, parviennent à dégrader le cartilage au cours de l'OA [50]. Le radical libre inorganique (NO) semble être un facteur potentiel agissant sur le catabolisme du cartilage durant la pathologie de l'OA et peut induire la mort des chondrocytes par apoptose [53]. Il a été montré que les chondrocytes actifs produisent plus de NO que les autres cellules du corps [54], et que ceux des patients atteints d'OA produisent une grande quantité de NO comparativement aux chondrocytes en conditions physiologiques [49]. Étant donné que le cartilage arthrosique produit une grande quantité de NO, des niveaux élevés de nitrite/nitrate ont été retrouvés dans les sérums ainsi que dans le liquide synovial des patients atteints d'OA. Ceci est expliqué par les grandes quantités de la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS), responsable de la production du NO [51].

Le NO est connu pour ses capacités cataboliques affectant le cartilage selon différents mécanismes. Il est capable d'induire l'apoptose des chondrocytes articulaires [55], et il est compté parmi les cibles thérapeutiques puisque la réduction de sa production diminue les symptômes ainsi que la progression de la maladie. Certaines études chez les chiens de modèles arthrosique *anterior cruciate ligament* (ACL) ont effectivement démontré que l'administration par voie orale des inhibiteurs d'iNOS réduit l'érosion du cartilage ainsi que le nombre de chondrocytes qui meurent par apoptose [53]. D'autres études ont montré que, une fois stimulés avec l'IL-1, le NO inhibe la production des facteurs de croissance (TGF- β ₁) des chondrocytes. De plus, il possède des action antagoniste sur l'IGF-1, responsable de la stimulation de la

synthèse des protéoglycanes de la matrice comme l'aggrécane [54]. D'autre part, il favorise l'activité des MMP et réduit la synthèse des récepteurs antagonistes de l'IL-1 (IL-1Ra) par les chondrocytes. Ceci conduit à une augmentation de la dégradation du cartilage provoquée par les niveaux élevés de l'IL-1 provoqués par leurs propres récepteurs IL-1R1 et IL-1RII [49].

1.2.2.3 Eicosanoïdes : Prostaglandine E (PGE2)

L'acide gras polyinsaturé de 20 atomes de carbone, connu sous le nom de l'acide arachidonique (AA), peut être relâché par la membrane phospholipidique sous l'action de l'enzyme phospholipases A2 (PLA2) et libérer des médiateurs lipidiques biologiquement actifs que sont les eicosanoïdes. L'AA provient de l'acide linoléique, un acide gras oméga 6. Ces acides gras ne sont pas synthétisés par la cellule et proviennent seulement de l'alimentation. Ceci fait que la biosynthèse des eicosanoïdes dépend de la biodisponibilité de l'AA [56]. Les eicosanoïdes représentent un réseau complexe du corps humain et sont impliqués dans le contrôle des processus physiologiques et pathophysiologiques. Ils interviennent notamment dans l'intégrité gastro-intestinale, l'homéostasie vasculaire, l'agrégation plaquettaire et peuvent être également impliqués dans les processus douloureux inflammatoires, auto-immuns et cancéreux [57].

La production de ces médiateurs lipidiques se fait par une variété de cellules et par des réponses à différents stimuli comme les cytokines, les facteurs de croissance et le traumatisme. Ils sont subdivisés en 4 classes : les prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes), les leucotriènes, les hepoxilines et les lipoxines [57]. L'acide arachidonique AA libéré de la membrane phospholipide par la Phospholipase A2 (PLA2) et métabolisé par trois voies enzymatiques : cyclooxygénases, lipoxygénases et cytochrome P450. L'AA subit une

réaction d'oxygénation par les cyclooxygénases (COX) pour former les prostaglandines (PGE2, PGD2 et PGF2), les prostacyclines PGI2 et les thromboxanes (TXA2 et TXB2). Il est également métabolisé par une autre voie enzymatique, le cytochrome P450, qui forme l'acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETEs) et les acides époxy-eicosaténoïques (EETs) [58]. La voie des lipoxygénases, quant à elle, permet la biosynthèse des leucotriènes (LTs) et des lipoxines, composés impliqués dans la régulation des réponses cellulaires importantes générées lors de l'inflammation et durant l'allergie (voir figure 5).

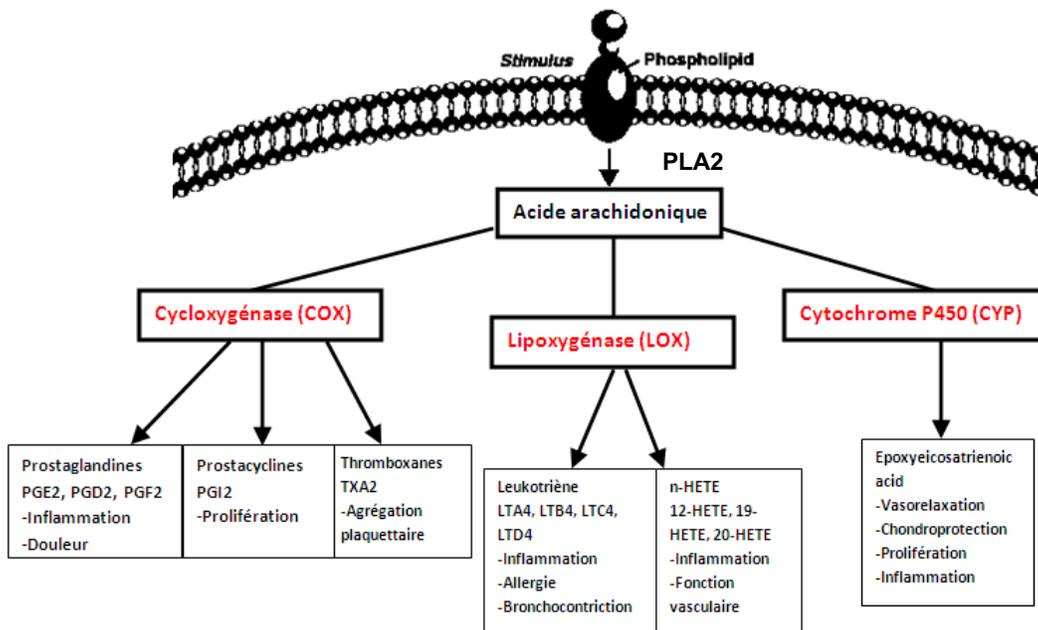


Figure 5 : La biosynthèse des eicosanoïdes.

(Adapté de [59]).

Comme mentionné plus tôt, la formation des prostaglandines, des prostacyclines et des thromboxanes se produit, en premier, par une réaction d'oxygénation sous l'action de la COX, ceci formant la PGG2. Cette dernière sera ensuite réduite par des enzymes de type peroxydase afin de former la PGH2, un métabolite instable qui n'agit pas en tant que médiateur inflammatoire. Ce dernier agit plutôt comme substrat pour des enzymes spécifiques,

responsables dans la formation des prostanoïdes plus stables incluant PGE2, PGD2, PGF2, PGI2 et TXA2. Leur synthèse est faite par des enzymes de types synthases : PGE2, PGD2, PGF2, PGI2 et TXA2 synthases (figure 6). En général, dans les tissus non inflammés, les prostaglandines sont produites en moins grande quantité. Par contre, lors d'une réaction inflammatoire, leur production augmente afin de recruter les leucocytes et les autres cellules du système immunitaire [60].

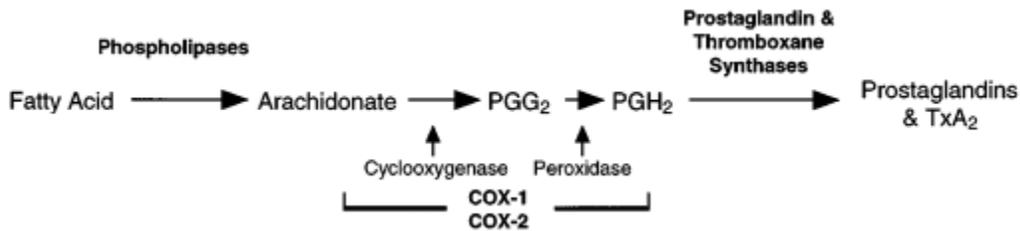


Figure 6 : Biosynthèse des eicosanoïdes : la voie des cyclooxygénases.
(Adapté de [61]).

La COX existe sous deux isoformes différentes : COX-1 et COX-2, ayant toutes les deux une similarité dans leur structure, mais différentes dans leur expression. La COX-1 est exprimée de manière constitutive dans plusieurs tissus du rat, du chien et de l'humain, comme dans le foie, les poumons, l'estomac. Son activité est responsable de la production des prostaglandines cytoprotectrices. La COX-2, bien que sa séquence soit homologue à la COX-1, son expression est plutôt induite par des stimuli extracellulaires et intracellulaires, dont par la présence du lipopolysaccharide bactérien LPS, de l'IL-1, du *Tumor Necrosis Factor* (TNF), de l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), du *Transforming Growth Factor Alpha* (TGF- α), de l'interféron γ , de l'acide rétinoïque pour ne nommer que ceux-là. [61]. La COX-2 est responsable de l'augmentation de la synthèse des prostanoïdes pro-inflammatoires PGE2 et PGI2. De plus, il a

été démontré que l'expression et la production de la COX-2 sont augmentées au niveau de la membrane synoviale des patients atteints de l'OA [62].

La prostaglandine E synthase-1 microsomale (m-PGES-1) est l'enzyme clé impliquée dans la biosynthèse de la PGE2. Cette dernière joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de l'arthrose. Sa synthèse se fait par les chondrocytes, les synoviocytes et les macrophages. Elle est retrouvée en abondance dans l'articulation des patients atteints d'OA, surtout au niveau du liquide synovial et du cartilage [63]. Elle joue un rôle pro-inflammatoire en exacerbant la dégradation du cartilage puisqu'elle réduit la synthèse du collagène et des protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Elle augmente également la production des médiateurs inflammatoires et cataboliques qui incluent les MMPs. De plus, le processus inflammatoire est amplifié parce que la PGE2 augmente l'expression de l'IL-1 β . L'implication de la PGE2 dans la pathologie a été démontrée par certaines études qui ont trouvé qu'une réduction du niveau du PGE2 dans le liquide synovial est associée à l'inhibition de la production du NO et corrélée à la réduction de l'activité des MMPs dans le cartilage [49].

1.3 La voie de lipoxygénases

La voie des lipoxygénases comporte trois enzymes peroxydantes lipidiques qu'on retrouve dans le tissu humain, incluant les 5-LOXs, 12-LOXs et 12/15-LOXs. Leurs noms correspondent à la position du carbone de l'AA qui subit l'oxygénation puisque ce sont des enzymes qui ont la capacité d'introduire un atome d'oxygène à une position précise au niveau des acides gras polyinsaturés. Ces enzymes sont impliqués dans la biosynthèse des leucotriènes et des lipoxines (figure 7). Ces produits sont importants dans les réponses biologiques de l'inflammation et dans les réactions d'hypersensibilité. La 5-LOX est une enzyme impliquée

dans la régulation de l'inflammation et intervient dans la biosynthèse des leucotriènes [64]. Une autre lipoxigénase humaine a été récemment clonée, la 15-LOX qui se retrouve sous deux isoformes 15-LOX1 et 15-LOX2, et qui diffèrent entre elles par leurs substrats ciblés et par le type cellulaire dans lequel elles sont exprimées. Cette lipoxigénase produit mêmes métabolites que la 12/15-lipoxigénase, mais elle joue un rôle physiologique différent [65]. La 15-LOX1 est présente dans les réticulocytes, les éosinophiles et les macrophages. Elle convertit l'acide linoléique en 13(S) acide hydroxyoctadécadiénoïque (13-HODE) alors que la 15-LOX2 est plutôt exprimée dans les cellules de la prostate, les poumons et la cornée, et convertit l'acide arachidonique en 15(S) acide hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) [66].

Comme précisé précédemment, la 5-LOX est responsable de la biosynthèse des leucotriènes LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄. Ces métabolites sont considérés comme des agents pro-inflammatoires potentiels, impliqués dans la physiopathologie de plusieurs maladies inflammatoires et dans les réactions d'hypersensibilité immédiate comme l'asthme, le psoriasis et l'arthrite rhumatoïde [58]. D'une part, il a été démontré que le LTB₄ a la capacité d'activer la phagocytose, la chimiotaxie, l'adhésion et l'agrégation cellulaire. De plus, son activité s'avère être élevée dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrose [51]. D'autre part, les LTC₄, LTD₄ et LTE₄ sont de nature vasoactive et ont la capacité de stimuler la bronchoconstriction [58].

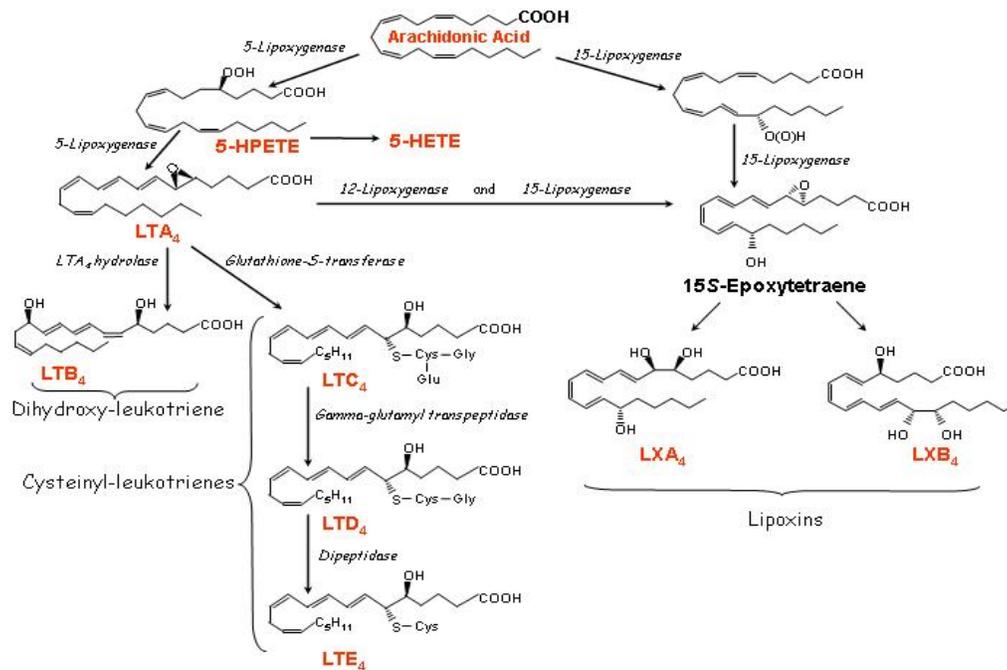


Figure 7 : Schéma de la voie des lipoxigénases.

[http : //www.gremi.asso.fr/images/LTLX.jpg](http://www.gremi.asso.fr/images/LTLX.jpg)

1.3.1 La 12/15-lipoxygénase (12/15-LOX)

1.3.1.1 Expression et régulation

La lipoxygénase humaine des voies aériennes et des leucocytes, la 12/15-lipoxygénase, diffère de la 5-LOX et de la 12-LOX par la spécificité de la position de l'oxygénation, par ses propriétés enzymatiques et par les tissus dans lesquels elle est exprimée. Cette enzyme est présente dans une multitude de cellules de mammifères comme dans celles du lapin, du bovin, du porc, de la souris et du rat. Dans l'articulation, la 12/15-LOX est exprimée au niveau des cellules du cartilage [67], de la membrane synoviale [68] et de l'os [69]. Son expression est régulée par des mécanismes spécifiques pour chaque tissu et par des modulateurs solubles d'inflammation. En condition physiologique, l'expression tissulaire de la 12/15-LOX est spécifique aux cellules épithéliales, aux éosinophiles, aux monocytes, aux macrophages et aux réticulocytes. Elle peut

être exprimée chez d'autres types cellulaires comme les cellules lisses musculaires, les cellules endothéliales et les kératinocytes.

L'activité et l'expression de la 12/15-LOX sont associées à l'inflammation parce que certains médiateurs inflammatoires régulent l'activité de la 12/15-LOX en affectant son expression protéique dans les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales des voies aériennes. Ces médiateurs peuvent inclure l'interleukine-4 (IL-4) et l'interleukine-13 (IL-13), ainsi que l'angiotensine II qui conduit à des conditions physiopathologiques d'hypertension et d'athérosclérose [65].

1.3.1.2 Localisation et structure

Les lipoxygénases présentent plusieurs activités catalytiques, bien qu'elles soient classées comme des dioxygénases des chaînes d'acide gras. L'évolution des enzymes lipoxygénases n'a pas clairement été étudiée, mais leur détection a été effectuée chez plusieurs espèces telles que les plantes, les animaux, les organismes marins inférieurs et chez les microbes [70]. Or, des recherches ont montré que les gènes LOXs sont absents chez certaines bactéries dont les *Pseudomonas aeruginosa*, *Sorangium cellulosum*, et la cyanobactérie *Nostoc punctiforme* [71]. Selon ces études, l'absence des gènes LOXs dans ces bactéries est due à leur acquisition des séquences d'eucaryotes. Il existe différentes isoformes de LOXs et l'existence de six gènes LOX fonctionnels a été indiquée. Tous les gènes LOX humains, incluant celui du 12/15-LOX et excluant celui du 5-LOX, sont effectivement regroupés sur le bras court du chromosome 17. En ce qui concerne le génome murin, il existe sept gènes LOX fonctionnels retrouvés sur le chromosome 11 (figure 8)

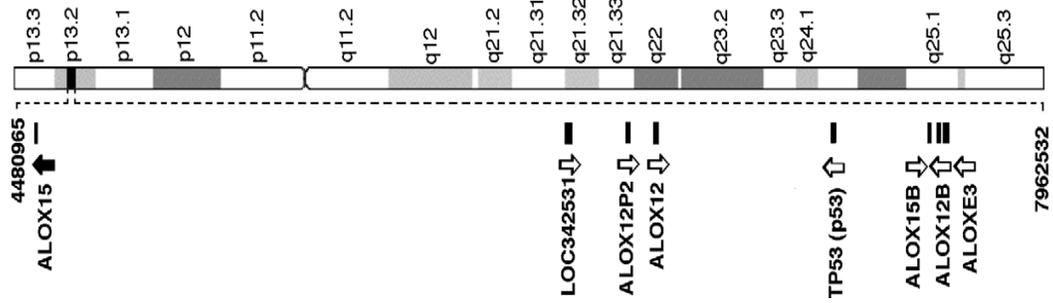


Figure 8 : Localisation des gènes 15-LOX, incluant la 12/15-LOX sur le chromosome 17. (Adapté de [71]).

Les dioxygénases des chaînes d'acide gras, les LOX, sont formées d'une seule chaîne polypeptidique de 75kDa. Dans leur structure, elles contiennent un fer non lié au soufre par mole d'enzyme. Leur structure cristalline indique que la chaîne polypeptidique est pliée sous forme d'une structure contenant deux domaines. Le grand domaine catalytique C-terminal est sous forme hélicoïdale comprenant 550 acides aminés et contenant le site catalytique dans lequel est enfoui le fer non lié au soufre. Le petit domaine N-terminal contient 110 acides aminés et est composé de deux feuillets β antiparallèles contenant quatre brins. Les acides aminés regroupés dans la structure 3D de la 12/15-LOX au fond de la poche de liaison au substrat sont les suivants : Ile418, Met419, Phe353, Leu589 et Ile593. Le volume de la poche de liaison au substrat est déterminé par la géométrie des chaînes latérales de ces acides aminés et le volume du site actif est essentiel à la spécificité de la réaction des 12/15-LOX [71].

1.3.2 Le rôle des métabolites de la 12/15-LOX

La 12/15-LOX est l'enzyme responsable de la production des lipoxines et des hepoxilines. Ces métabolites se retrouvent en général dans le liquide synovial humain d'une articulation. Les acides gras sont les substrats utilisés par cette enzyme afin de permettre la catalyse des réactions d'oxygénations dont elle est responsable. Les premiers produits de la 12/15-LOX sont la 13S-HPODE et la 15S-HPETE qui sont réduits sous l'action du phospholipide glutathion peroxydase (phGPx) en 13-HODEs et 15-HETEes, qui proviennent de l'acide linoléique et de l'acide arachidonique respectivement [71].

Les produits de la 12/15-LOX, 15-HETE et 13-HODE possèdent des effets chondroprotecteurs et agissent comme des médiateurs anti-inflammatoires. Des études ont montré qu'ils ont la capacité d'abaisser la production des métalloprotéinases MMP-1 et MMP-13 induite par l'IL-1 β chez les chondrocytes humains en raison de leur interaction avec les récepteurs nucléaires PPAR gamma [72]. Ces métabolites inhibent la production de certaines interleukines pro-inflammatoires comme l'IL-8 et le TNF- α , cytokine impliquée dans la destruction du cartilage au cours de l'OA [67]. Ils ont également un effet inhibiteur sur l'expression de l'iNOS chez les macrophages [73]. Les études ont aussi démontré que la synthèse de certaines leucotriènes pro-inflammatoires comme la LTB₄ et la LTC₄ peut être bloquée par la 13-HODE et la 15-HETE [65].

Les lipoxines LXA₄ et LXB₄ sont synthétisées par la 12/15-LOX et sont impliquées dans l'arrêt de la réponse inflammatoire [74]. Elles ont un effet inhibiteur sur la cytotoxicité des cellules tueuses naturelles [75]. De plus, elles jouent un rôle anti-inflammatoire en inhibant la chimiotaxie, l'adhésion, la migration cellulaire et la génération des molécules superoxydes [71]. Au niveau des fibroblastes de la membrane synoviale humaine, la LXA₄ a la capacité de bloquer

la production de l'IL-6, IL-8 et MMP-3 et d'augmenter la production des inhibiteurs des métalloprotéinases tissulaires TIMP-1 et TIMP-2 [76]. Elle est également impliquée dans le blocage de la synthèse de la leucotriène pro-inflammatoire LTC₄ [65].

1.3.3 Les propriétés anti-inflammatoires et protectrices de la 12/15-LOX

La 12/15-LOX possède un rôle protecteur contre diverses maladies inflammatoires et dégénératives. Cela a été démontré par des études utilisant des modèles animaux transgéniques. Une surexpression de la 15-LOX-1 dans un modèle animal de lapin transgénique a montré une diminution de la réponse inflammatoire qui engendre une protection contre la perte de la masse osseuse. La surexpression de la 15-LOX-1 engendre également une protection contre l'inflammation induite dans le modèle de parodontite aiguë [77]. D'autres études ont démontré que le modèle animal d'athérosclérose dans lequel les monocytes et les macrophages surexpriment le gène de la 12/15-LOX, présente peu de dépôt des lipides dans la paroi des vaisseaux, ce qui procure une protection contre l'athérosclérose [78]. Par ailleurs, des effets anti-inflammatoires de la 15-LOX ont été démontrés à la suite de la transfection de rein de rat avec la 15-LOX par la suppression de l'inflammation et par la préservation de la fonction lors de glomérulonéphrite expérimentale [79]. La délétion de la 12/15-LOX exacerbe la néovascularisation inflammatoire par l'augmentation de l'expression des médiateurs de l'angiogenèse inflammatoire VEGF-A et le récepteur de VEGF-3 (FLT4) [80]. D'autres études ont montré que la délétion de la 12/15-LOX provoque une encéphalomyélite allergique expérimentale sévère dans un modèle animal atteint de sclérose en plaque [81]. La 12/15-LOX est exprimée dans plusieurs composantes de l'articulation du genou. Dans le cartilage, elle est exprimée au niveau des chondrocytes [67]. De plus, elle se retrouve également au niveau de la

membrane synoviale et ses métabolites sont exprimées dans le liquide synovial [68]. La 12/15-LOX est aussi exprimée dans l'os[69]. Son expression dans les articulations du genou reflète son implication dans la pathogenèse de l'arthrose. Cependant, le rôle de la 12/15-LOX dans cette pathogenèse n'a pas été investigué, d'où l'intérêt d'explorer les propriétés anti-inflammatoires et protectrices de la 12/15-LOX et ses métabolites dans cette présente étude.

Article scientifique

Le développement accéléré de l'arthrose induite par le vieillissement et l'arthrose induite par l'instabilité chez des souris déficientes en 12/15-lipoxygénase.

Hypothèse :

Le but de cette étude est d'investiguer le rôle de 12/15-LOX dans la pathogenèse de l'OA. La délétion de 12/15-LOX exacerberait la progression de l'arthrose induite par le vieillissement et l'arthrose induite par instabilité chez la souris. Cette aggravation serait associée à une augmentation de l'expression des gènes inflammatoires et cataboliques au niveau du cartilage.

But :

1-Étudier le rôle de la 12/15-lipoxygénase dans la pathogenèse de l'OA et explorer l'effet de sa délétion sur l'état du cartilage des souris et identifier les médiateurs cataboliques et inflammatoires.

2-Connaître les effets des métabolites de la 12/15-lipoxygénase sur les réponses inflammatoires et cataboliques *in vitro*.

3-Définir quel métabolite de la 12/15-lipoxygénase est responsable des effets bénéfiques sur le cartilage des souris *in vivo*.

Osteoarthritis and Cartilage

Accelerated development of aging-associated and instability-induced 1 osteoarthritis in 12/15-lipoxygenase deficient mice

Lauris Habouri, MSc¹, Fatima Ezzahra El Mansouri, PhD¹, Yassine Ouhaddi, MSc¹, Bertrand Lussier, DMV, MSc, Dipl ACVS², Jean-Pierre Pelletier, MD¹, Johanne Martel-Pelletier, PhD¹, Mohamed Benderdour, PhD³ and Hassan Fahmi, PhD¹

¹Osteoarthritis Research Unit, University of Montreal Hospital Research Centre (CRCHUM), and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

²Faculty of Veterinary Medicine, Clinical Science, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

³Orthopedic Research Laboratory, Sacré-Coeur Hospital, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

Correspondence to:

Hassan Fahmi,
Osteoarthritis Research Unit,
University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM),
900 Saint-Denis, R11.424, Montreal, QC, Canada H2X 0A9

Running head

12/15-LOX in aging-associated and instability-induced OA

SUMMARY

Objective: 12/15-Lipoxygenase (12/15-LOX) catalyzes the generation of various anti-inflammatory lipid mediators, and has been implicated in several inflammatory and degenerative diseases. However, there is currently no evidence that 12/15-LOX has a role in osteoarthritis (OA). The aim of this study was to investigate the role of 12/15-LOX in the pathogenesis of OA.

Methods: The development of aging-associated and destabilization of the medial meniscus (DMM)-induced OA were compared in 12/15-LOX-deficient (12/15-LOX^{-/-}) and wild-type (WT) mice. The extent of cartilage damage was evaluated by histology. The expression of OA markers was evaluated by immunohistochemistry and RT-PCR. Cartilage explants were stimulated with IL-1 α in the absence or presence of the 12/15-LOX metabolites, 15-HETE, 13- HODE or LXA4, and the levels of MMP-13, NO and PGE₂ were determined. The effect of LXA4 on the progression of OA was evaluated in WT mice.

Results: The expression of 12/15-LOX in cartilage increased during the progression of DMM-induced OA and with aging in WT mice. Cartilage degeneration was more severe in 12/15-LOX^{-/-} mice compared to WT mice in both models of OA, and this was associated with increased expression of MMP-13, ADAMTS5, iNOS, and mPGES-1. Treatment of cartilage explants with 12/15-LOX metabolites, suppressed IL-1 α -induced production of MMP-13, NO and PGE₂, with LXA4 being the most potent. Intra-peritoneal injection of LXA4 reduced the severity of DMM-induced cartilage degradation.

Conclusions: These data suggest an important role of 12/15-LOX in the pathogenesis of OA. They also suggest that activation of this pathway may provide a novel strategy for prevention and treatment of OA.

Key words

12/15-LOX; LXA4; Osteoarthritis; Cartilage

Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatic disorder and a leading cause of long-term disability¹. The major pathologic changes of OA include increased expression of inflammatory and catabolic mediators, progressive loss of articular cartilage, and subchondral bone remodeling². Multiple environmental factors, including aging, obesity, joint injury, and occupation, as well as genetic factors have been linked to the pathogenesis of OA¹; however, the exact pathomechanisms underlying OA development are still poorly understood. To date, there is no curative therapy for OA and the current treatments focus mainly on the symptoms rather than on the underlying causes. Better understanding OA pathogenesis would be helpful in the development of more effective strategies for OA prevention and treatment. Cartilage breakdown is predominantly caused by two enzyme families: MMPs (matrix metalloproteinases) and ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, aggrecanases), the main members being MMP-13, and ADAMTS5, respectively³. MMP-13 transgenic mice develop spontaneous OA like cartilage damage⁴, whereas MMP-13 knock-out (KO) mice are protected against OA cartilage damage⁵. Deletion of the ADAMTS5 gene was shown to protect against cartilage degradation in a joint instability model of OA⁶. Nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE₂) also play important roles in the pathogenesis of OA by enhancing the production of MMPs and pro-inflammatory mediators, and by suppressing the synthesis of collagen and proteoglycans³. The production of NO in cartilage is catalyzed by inducible NO synthases (iNOS), while microsomal PGE synthase-1 (mPGES-1) is the key enzyme in the biosynthesis of PGE₂.

12/15-Lipoxygenase (12/15-LOX) belongs to a family of enzymes that can metabolize unsaturated fatty acids to generate various anti-inflammatory mediators including 15

hydroxyeicosatetraenoic acids (15-HETE), 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE), and lipoxins (LXs)⁷⁻¹⁰. 12/15-LOX and its human homolog 15-LOX, are expressed in most articular tissues, including cartilage¹¹, synovium¹², and bone¹³ and its products are found in human synovial fluids¹².

Several studies have demonstrated that 12/15-LOX products act as chondroprotective and anti-inflammatory mediators. For example, we have shown that treatment with 15-HETE or 13-HODE suppressed interleukin (IL)-1 β -induced production of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes¹¹. 13-HODE and 15-HETE were also reported to suppress the expression of iNOS in macrophages¹⁴. Moreover, treatment with LXA4 inhibited the production of IL-6, IL-8, and MMP-3 while it enhanced the production of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and -2 in human synovial fibroblasts¹⁵.

Consistent with its anti-inflammatory effects *in vitro*, several studies have demonstrated a protective role of 12/15-LOX in animal models of inflammatory diseases. For instance, transgenic rabbits overexpressing 15-LOX-1 showed reduced inflammatory responses and were protected from both bone loss and inflammation-induced tissue damage in a model of acute periodontitis¹⁶. On the other hand, genetic deletion of 12/15-LOX exacerbates atherosclerosis¹⁷, experimental allergic encephalomyelitis¹⁸, and inflammatory neovascularization¹⁹.

Nevertheless, the role of 12/15-LOX in the pathogenesis of OA has not yet been investigated. In the present study, we explored the effect of 12/15-LOX deletion on the course of aging-associated and instability-induced OA. In addition, we evaluated the direct effect of 12/15-LOX metabolites on the expression of key inflammatory and catabolic mediators in cultured cartilage explants. The effect of LXA4 on the progression of OA in wild type (WT) mice was also investigated.

Materials and methods

Mice

All animal experiments were approved by the Institutional Animal Protection Committee of the University of Montreal Hospital Research Centre (CRCHUM). 12/15-LOX^{-/-} mice and wild type WT C57BL/6 mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). 12/15-LOX^{-/-} mice were generated as described previously²⁰. These mice were backcrossed onto the C57BL/6 background for at least 11 generations. 12/15-LOX^{-/-} and WT mice used in these experiments were generated by breeding heterozygous littermates, and genotypes were identified by polymerase chain reaction (PCR) of tail biopsy DNA extract. Mice were maintained under 12-h light/dark cycle and were freely allowed access to food, water and activity before and after surgery. The mice appeared healthy, had no alterations in spleen size, and showed normal behavior throughout the study (maximum age of used mice was 9 months). For these studies, a total of 264 (162WT and 102 12/15-LOX^{-/-}) mice were used.

Aging-associated and instability-induced OA models

In the aging-associated OA model, 12/15-LOX^{-/-} and WT mice were sacrificed at 3, 6 and 9 months of age. Knees were harvested and subjected to histological and immunohistochemical analyses. The destabilization of the medial meniscus (DMM) was induced in the right knee joints of 10-week-old male WT and 12/15-LOX^{-/-} mice as described previously²¹. Briefly, animals were anesthetized and the right knee joint was destabilized by transection of the anterior attachment of the medial meniscotibial ligament (MMTL). Mice were sacrificed at 2, 4, and 8 weeks post-DMM surgery and the joints were evaluated for the development of OA. Only male mice were used in vivo in this study because male mice develop better features of the disease²². None of the mice died during the experimental period.

Histological analysis of cartilage

WT and 12/15-LOX^{-/-} mice were euthanized at 3, 6, and 9 months of age (n = 6 per time point per genotype) and at 2, 4 and 8 weeks post-DMM surgery (n = 8 per time point per genotype) and the harvested knee joints were fixed in TissuFix (Chaptec, Montreal, QC), decalcified in RDO Rapid Decalcifier (Apex Engineering, Plainfield, IL), and embedded in paraffin. Coronal sections (5-mm) were obtained through the entire joint at 80 mm intervals and stained with Safranin O/fast green (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Eight sections from each mouse were graded by two scorers (LH and MB) blinded to the specimens in accordance with the recommendations of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) guidelines²³. The four quadrants (medial tibial plateau, medial femoral condyle, lateral tibial plateau, and lateral femoral condyle) of the knee were assessed and the scores were added to obtain the summed score.

Immunohistochemistry

Knee joints from 3- (n = 4 per genotype), and 6-month-old (n = 5 per genotype) mice and from sham- (n = 4 per genotype) and DMM-operated (n = 5 per genotype) mice at 2 weeks post-surgery were fixed in TissuFix, decalcified in 10 % EDTA for 14 days at 4°C, and embedded in paraffin. Immunohistochemical analysis was performed as previously described^{24,25}. For further details, see Supplementary Methods.

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

Knee cartilage specimens from WT and 12/15-LOX^{-/-} mice at the ages of 3 and 6 months (n = 5 per time point per genotype), and from sham and DMM-operated mice (n = 5 per time point per genotype) at 2 weeks post-surgery were collected, and pooled together for the isolation

of total RNA using the TRIzol® reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed and amplified using the QuantiTect Reverse Transcription PCR Kit (QIAGEN) on the Rotor Gene 3000 realtime PCR system (Corbett Research, Mortlake, Australia) according to the manufacturer's protocol. Relative messenger RNA (mRNA) expression was determined using the DDCT method and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the housekeeping gene. Each PCR was performed in triplicate from two independent experiments.

Culture of cartilage explants

Femoral heads from 3- to 4-week-old WT mice were placed in 24-well plates (6 femoral heads (3 mice) per well) at 37°C in 500 ml of DMEM containing antibiotics and 10 % fetal calf serum for 48 h before stimulation with interleukin-1 α (IL-1 α) in the absence or presence of the 12/15-LOX products 15-HETE, 13-HODE and LXA4 (Cayman Chemical). A detailed description of isolation of culture of cartilage explants can be found in the Supplementary Methods.

LXA4 administration

Ten-week-old WT mice were subjected to sham (n =14) or DMM (n =14) surgery. Following surgery, DMM-operated mice were intraperitoneally injected with either LXA4 (5 mg/kg body weight; injection volume 0.2 ml) or vehicle control (PBS) (n =7 mice per group) daily for 8 weeks. Sham animals also received LXA4 or vehicle control (n = 7 mice per group) according to the same schedule as the DMM-operated animals. The injection site alternated daily

between left and right sides of the abdomen. The mice were closely monitored during the study. The LXA4 solution was freshly prepared every day before each injection.

Statistical analysis

Histological and immunohistochemical data were assessed using the Mann Whitney U test (for comparison of two groups), or Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test (for comparison between more than two groups). Cohen d was calculated as a measure of effect size. Values lower than 0.5 indicate a small effect, values between 0.5 and 0.8 show a medium effect and values higher than 0.8 represent a large effect. Analysis of the release of MMP-13, NO, and PGE₂ was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. P-value < 0.05 was considered significant. All analyses were performed using Prism 7.0 (GraphPad). Data are reported as the median with interquartile range [IQR] or the mean ± SD.

Results

Up-regulation of 12/15-LOX expression in cartilage during the progression of DMM-induced OA and aging

First, we examined the expression of 12/15-LOX protein in articular cartilage of WT mice during the development of DMM induced OA at 2, 4 and 8 weeks post-surgery (n = 5 per time point). Our results showed that 12/15-LOX was expressed in cartilage from sham-operated mice and its level increased significantly at 2 weeks post-surgery. The expression level of 12/15-LOX was further up-regulated at 4 weeks post-surgery, and slightly declined at 8 weeks [Fig. 1(A) and (C)]. We also examined the expression of 12/15-LOX in articular cartilage during aging in WT mice (n = 5 per time point). As shown in Fig. 1(B), 12/15-LOX expression increased with age. At 6 months of age, the levels of 12/15-LOX were ~2-fold higher compared to cartilage from 3-month-old mice. The staining was further enhanced at 9 months of age and remained elevated at 15 months [Fig. 1(B) and (D)].

Next, we performed real-time PCR analyses to determine whether the observed changes in the protein levels were paralleled by changes in the mRNA levels. mRNA gene expression was evaluated as percentage over control (sham-operated or 3-month-old mice) after normalization to the internal control gene, GAPDH. Consistent with the changes in the protein levels, 12/15-LOX mRNA increased during the progression of OA and tended to decrease at a late stage of the disease in the DMM model [Fig. 1(E)] (n = 2 replicates, 5 joints per group). At 2 weeks post-surgery, the levels of 12/15-LOX mRNA in cartilage (Mean Ct value ~21.5) were higher than in cartilage from sham-operated animals (Mean Ct value ~22.7). At 4 weeks post-surgery, the expression level of 12/15-LOX mRNA was further up-regulated (Mean Ct value ~21.2) and slightly decreased at 8 weeks (Mean Ct value ~21.8) [Fig. 1(E)].

The patterns of 12/15-LOX mRNA changes were similar to those of 12/15-LOX protein changes during aging. The levels of 12/15-LOX mRNA in cartilage from 6-month-old mice (Mean Ct value ~22.2) were higher compared to cartilage from 3-month-old mice (Mean Ct value ~22.8), and remained increased at 15 months of age (Mean Ct value ~21.7) [Fig. 1(F)]. These findings suggest that the observed changes in 12/15-LOX expression might be involved in the pathophysiology of OA.

Accelerated development of aging-associated and instability induced OA in 12/15-LOX deficient mice

In order to determine the role of 12/15-LOX in the development of OA, we examined the appearance and characteristics of the articular cartilage in the knee joint of 12/15-LOX^{-/-} mice and their WT littermates at 3, 6, and 9 months (n = 6 mice per genotype per time point). Knee joints from WT mice showed healthy articular cartilage with little or no changes through 3-9 months [Fig. 2(A)]. 12/15-LOX^{-/-} knee joints, in contrast, revealed a mild decrease in Safranin O staining, surface irregularities, small fibrillations and vertical clefts at 6 months. These changes were more pronounced at 9 months [Fig. 2(B)]. We also evaluated cartilage integrity using the OARSI scoring systems. The results revealed that the summed scores for 12/15-LOX^{-/-} mice and their WT littermates were virtually similar at 3 months [Fig. 2(C)]. In contrast, the scores were significantly increased in 12/15-LOX^{-/-} mice compared to WT mice at 6 (Cohen's d = 2.35) and 9 (Cohen's d = 3.6) months [Fig. 2(C)], confirming increased cartilage damage in 12/15-LOX^{-/-} mice. These data suggest that 12/15-LOX deficiency accelerates the progression of spontaneous aging-related cartilage degeneration.

We next analyzed the development of DMM-induced OA changes in WT and 12/15-LOX^{-/-} mice (n = 8 mice per genotype per time point). Histology showed that DMM surgery induced progressive cartilage damage in knee joints from both 12/15-LOX^{-/-} mice and their WT littermates; however, the damage was more accelerated and more exacerbated in 12/15-LOX^{-/-} joints at 2, 4 and 8 weeks post-surgery (Fig. 3). Quantification of OA severity by the OARSI grading system confirmed that the progression of OA structural changes was accelerated in 12/15-LOX^{-/-} mice compared with WT mice at each time point [Fig. 3(C)]. The effect size was large at 2- (Cohen's d = 1.2), 4- (Cohen's d = 1.5), and 8- weeks (Cohen's d = 2.08) postsurgery. Together, these data indicate that 12/15-LOX deletion exacerbates cartilage destruction in both the spontaneous aging-associated and DMM-induced OA models.

Increased expression of catabolic and inflammatory mediators in 12/ 15-LOX^{-/-} mice

To determine whether the acceleration of OA progression in 12/ 15-LOX^{-/-} mice was due to enhanced expression of cartilage- degrading enzymes, we analyzed the expression of ADAMTS5 and MMP-13 in the knee joints from 3- (n = 4 per genotype), and 6- month-old (n = 5 per genotype) mice and from sham- (n = 4 per genotype) and DMM-operated (n = 5 per genotype) mice at 2 weeks post-surgery.

We selected these enzymes because they are the major catabolic enzymes associated with pathological degradation of cartilage in OA³⁻⁶. We found that the expression levels of ADAMTS5 and MMP- 13 were very low to undetectable in knee joints of both genotypes at 3 months and in WT mice at 6 months, but were significantly higher in the knee joints of 12/15-LOX^{-/-} mice at 6 months [Fig. 4(A)]. In the DMM model, the expression levels of ADAMTS5, and MMP-13 were almost undetectable in sham-operated knees and increased at 2 weeks after

DMM surgery [Fig. 5(A)]. It is noteworthy that the increased expression of ADAMTS5, and MMP-13 was more pronounced in 12/15-LOX^{-/-} mice [Fig. 5(A)].

Next we evaluated the appearance of the type II collagen and aggrecan breakdown products C1,2C and VDIPEN. Cartilage of 6-month-old 12/15-LOX^{-/-} mice exhibited greater C1,2C and VDIPEN staining than those of age-matched control mice (Suppl Fig. 1). In the DMM model, the staining for the C1,2C and VDIPEN epitopes was observed in cartilage from both 12/15-LOX^{-/-} and WT mice at 2 weeks post-DMM, but was greater in tissue from 12/15-LOX^{-/-} (Suppl Fig. 2). These data further suggest that 12/15-LOX deletion enhanced cartilage ECM degradation.

We also analyzed the expression of the pro-inflammatory genes iNOS and mPGES-1. Results showed that both genes were highly expressed in the knee joint of 12/15-LOX^{-/-} mice compared to WT mice at 6 months of age [Fig. 4(A) and (B)]. The expression levels of iNOS, and mPGES-1 were also enhanced in both genotypes at 2 weeks post-DMM surgery, with the increase being significantly higher in 12/15-LOX^{-/-} mice compared to WT mice [Fig. 5(A) and (B)].

Consistent with the immunohistochemical data, real-time PCR analyses revealed a significant increase in MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 mRNA in 12/15-LOX deficient mice compared to WT control mice at 6 months of age (n = 2 replicates, 5 joints per group) [Figs. 4(C) and 5(C)]. Mean Ct values in WT and 12/15-LOX^{-/-} mice were 24.1 and 22.4 for ADAMTS5, 20.6 and 18.9 for MMP-13, 25.1 and 23.6 for iNOS, and 21.5 and 19.8 for mPGES-1, respectively. In the DMM model, the levels of ADAMTS5, MMP-13, iNOS and mPGES-1 mRNA were also more elevated in 12/15-LOX^{-/-} mice compared to their WT littermates at 2 weeks post-surgery [Fig. 5(C)]. Mean Ct values in WT and 12/15-LOX^{-/-} mice

were 21.7 and 20.8 for ADAMTS5, 17.5 and 16.9 for MMP-13, 23.2 and 21.8 for iNOS, and 18.7 and 18.1 for mPGES-1, respectively. These results demonstrate that the deletion of the 12/15-LOX gene leads to increased expression of MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1, which may contribute to the observed exacerbation of cartilage degeneration.

12/15-LOX metabolites inhibited IL-1 α -induced inflammatory and catabolic responses in cartilage explants

To further characterize the protective effects of 12/15-LOX, we evaluated the impact of 12/15-LOX derived products on inflammatory and catabolic responses in cultured cartilage explants from WT mice (n = 3 replicates, 3 mice (6 femoral heads) per group). Explants were stimulated with IL-1 α in the absence or presence of 13-HODE, 15-HETE and LXA4 and the levels of MMP-13, PGE₂, and NO in conditioned media were determined. As shown in Fig. 6, the levels of MMP-13, PGE₂ and NO were reduced in the presence of 13-HODE, 15-HETE and LXA4. It is noteworthy that LXA4 was the most potent inhibitor of MMP-13, PGE₂, and NO production. Together these data suggest that 12/15-LOX and its metabolites are important regulators of inflammatory and catabolic responses in cartilage, with LXA4 being the most potent.

The 12/15-LOX product LXA4 reduced the severity of DMM-induced cartilage degradation

In view of the effect of LXA4 on catabolic and inflammatory responses in vitro, we hypothesized that LXA4 may have protective effects in vivo. To test this hypothesis, we examined the effect of LXA4 on OA development in WT mice subjected to sham or DMM

surgery (n = 7 in each group). One day post-surgery, mice were intraperitoneally injected with PBS (control) or LXA4 (5 mg/kg body weight/day; injection volume 0.2 ml) daily for 8 weeks. Treatment with LXA4, but not with PBS (control) decreased the severity of OA like changes, most notably proteoglycan depletion, fibrillations, and cartilage loss (Fig. 7). There were no structural changes in the knees of sham-operated mice treated with PBS or LXA4 (Fig. 7). OARSI histopathology grading confirmed a significant decrease, with a large size effect (Cohen's $d=1.38$), in the severity of OA-like changes in LXA4 treated mice compared with PBS-treated mice (Fig. 7). These results suggest that LXA4 attenuated the progression of OA in vivo.

Discussion

In the present study, we showed that 12/15-LOX is up-regulated in OA and aged cartilage. 12/15-LOX deletion accelerated the development of both instability-induced and spontaneous aging associated OA, with concomitant increases in the expression of MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1. Treatment of cartilage explants with 12/15-LOX products suppressed key inflammatory and catabolic responses, with LXA4 being the most potent. Furthermore, we demonstrated that intraperitoneal injection of LXA4 attenuated the severity of DMM-induced cartilage degradation in WT mice. These data suggest that the induction of the 12/15- LOX pathway could be an attractive new strategy for the treatment of OA

We first showed that 12/15-LOX expression increased during the development of DMM-induced OA and with aging in WT mice. The expression of 12/15-LOX decreased in the late phase of the surgical model of OA, and remained elevated at advanced ages in the aging model. One possible explanation is that 16 months represents an early stage of aging-associated OA, and long term analysis may be needed in the future to define the expression level of 12/15-LOX in

more advanced stages of aging-associated OA. These data suggest that the observed changes in 12/15-LOX expression could be, at least partially, implicated in the pathophysiology of OA.

Next, we investigated the role of 12/15-LOX deficiency in the development of both aging-associated spontaneous and DMM induced OA. We found that 12/15-LOX deletion exacerbated cartilage degradation in both the aging-associated and DMM-induced models. Immunohistochemical and real-time RT-PCR analyses revealed that the levels of key catabolic (MMP-13 and ADAMTS5) and pro-inflammatory (iNOS and mPGES-1) mediators were significantly higher in the knee joint of 12/15-LOX^{-/-} mice compared to WT mice at 6 months. In the DMM model, the expression of the four genes was elevated in cartilage of both 12/15-LOX^{-/-} and WT mice at 2 weeks after DMM surgery, with the increased expression being more pronounced in knee joints of 12/15-LOX^{-/-} mice compared to WT mice. Together these data suggest that 12/15-LOX deletion contributes to the up-regulation of MMP-13, ADAMTS, iNOS and mPGES-1 and possibly other catabolic and inflammatory genes, which in turn mediate the exacerbation of cartilage degeneration.

Our studies with ex vivo cartilage explants revealed that treatment with LXA4, 15-HETE and 13-HODE, the main 12/15-LOX metabolites, down-regulated the production of MMP-13, NO and PGE₂, known for their prominent roles in the development and progression of OA. It is noteworthy that LXA4 was the most potent inhibitor. The protective effect of LXA4 was further confirmed in vivo. Intraperitoneal administration of LXA4 in WT mice reduced the progression of DMM-induced cartilage damage. These in vivo findings, together with our ex vivo analysis showing that LXA4 prevents the release of MMP-13, NO and PGE₂ suggest that inhibition of the production of these mediators is likely the mechanism by which LXA4 prevents cartilage degradation.

This is consistent with several previous studies showing that 12/15-LOX products are protective in vivo in animal models of inflammatory degenerative diseases. For example, administration of LXA4 and 15-HETE was reported to attenuate zymosan²⁶ and carrageenan-induced²⁷ arthritis, respectively. In addition, treatment with an LXA4 receptor agonist reduced the severity of murine collagen-induced arthritis²⁸. Accordingly, deletion of the ALX/FPR2 exacerbated disease severity in a serum-induced model of arthritis²⁹. Additional support for a protective role of LXA4 comes from the observation that mice transgenic for the human LXA4 receptor displayed reduced acute inflammatory and innate responses upon challenge³⁰. These studies, together with our findings showing that 12/15-LOX deficiency aggravates OA features and that 12/15-LOX products prevented inflammatory and catabolic responses in cultured explants, suggest that diminished levels of 12/15-LOX metabolites in the joint may contribute to the observed exacerbation of OA in 12/15-LOX deficient mice. Therefore, enhancing the levels of 12/15-LOX metabolites may constitute a novel strategy for prevention and treatment of OA. One potential avenue for consideration is the inhibition of the mPGES-1 and 5-LOX pathways. Dual inhibitors of mPGES-1/5-LOX block mPGES-1- and 5-LOX-mediated formation of pro-inflammatory eicosanoids PGE2 and LTB4, thereby shunting arachidonic acid toward formation of 12/15-LOX metabolites. Interestingly, licofelone, a dual 5-LOX/COX inhibitor was more protective than naproxen in preclinical animal studies³¹ and clinical human trials³².

This study has some limitations. First, our analyses were performed on relatively young mice (8-10 week-olds in DMM surgery and up to 9 months for aging studies) that may not recapitulate OA pathology in humans. Future studies investigating the effect of 12/15-LOX deletion in aged mice would shed more light on the role of 12/15-LOX in the pathogenesis of OA because OA is more prevalent among older adults. Second, we did not measure the levels of

12/15-LOX metabolites in our models of OA. Previous studies have shown that the levels of LXA4 in mice decreased with age³³ and obesity³⁴, two major risk factors for OA. Reduced levels of LXA4 were also described in a model of lupus, a rheumatic disease³⁵, and in a model of Alzheimer's disease, an aging-associated degenerative disease³³. In addition, the synovial levels of 13-HODE and 15-HETE were decreased in carrageenan-induced arthritis in dogs³⁶. More interestingly, the levels of LXA4 and 15-HETE were lower in human OA infrapatellar fat pads compared to normal tissue³⁷. Subsequent studies are warranted to characterize the levels of 12/15-LOX metabolites in other animal models and in patients with OA. Third, although our data suggests that 12/15-LOX metabolites may exert protective effects by reducing the expression of MMP-13, iNOS and mPGES-1, the molecular mechanisms underlying these processes are not completely elucidated. For example, we showed in a previous study that 15-HETE induces its anti-inflammatory and chondroprotective effects in a PPAR γ -dependent pathway¹¹. Another study found that 15-HETE exerts its effects preferentially via a PPAR δ -dependent pathway³⁸. Further work will be required to define the exact molecular and cellular mechanisms by which 12/15-LOX metabolites regulate inflammatory and catabolic responses.

In conclusion, the present study suggests that 12/15-LOX and its metabolites have protective effects both in vitro and in vivo, and that activation of 12/15-LOX in the joint could be an attractive new strategy for the treatment of OA.

Author contributions

All authors contributed to the conception and design of the study, acquisition, analysis or interpretation of the data. All authors were also involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version. H. Fahmi

(h.fahmi@umontreal.ca) as a corresponding author, takes responsibility of the integrity of the work as a whole, from inception to finished article.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Role of the funding source

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP-130293, and the Fonds de la Recherche du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) Grant Continuum-50679. The funding sources were not involved in the study design, collection, analysis and interpretation of data, the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

Acknowledgments

The authors thank Virginia Wallis for her assistance with the manuscript preparation. We would like to thank members (the managers, veterinarians, and animal caretakers) at the CRCHUM animal facility for their assistance and for maintaining the mice for this study.

Supplementary data

Supplementary data Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2017.07.001>.

References

1. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2014;28 :5-15.
2. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis : a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012;64 :1697-707.
3. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009;11 :224.
4. Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001;107 :35-44.
5. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, et al. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 2009;60 :3723-33.
6. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005;434 : 644-8.
7. Uderhardt S, Kronke G. 12/15-lipoxygenase during the regulation of inflammation, immunity, and self-tolerance. *J Mol Med Berl* 2012;90 :1247-56.
8. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation : dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 2008;8 :349-61.
9. Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, Taylor-Fishwick DA, Chakrabarti SK, Nadler JL. Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 2011;50 :115-31.
10. Kuhn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 2006;45 :334-56.
11. Chabane N, Zayed N, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, et al. Human articular chondrocytes express 15-lipoxygenase-1 and -2 : potential role in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11 :R44.
12. Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, et al. Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2007;34 :2144-53.
13. Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, et al. Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene Alox15. *Science* 2004;303 :229-32.

14. Ricote M, Welch JS, Glass CK. Regulation of macrophage gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Horm Res* 2000;54 :275-80.
15. Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J Immunol* 2000;164 :2660-6.
16. Serhan CN, Jain A, Marleau S, Clish C, Kantarci A, Behbehani B, et al. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *J Immunol* 2003;171 :6856-65.
17. Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, Serhan CN, Chan L. Atherosclerosis : evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEBJ* 2008;22 :3595-606.
18. Emerson MR, LeVine SM. Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15- lipoxygenase or 5-lipoxygenase. *Brain Res* 2004;1021 :140-5.
19. Leedom AJ, Sullivan AB, Dong B, Lau D, Gronert K. Endogenous LXA4 circuits are determinants of pathological angiogenesis in response to chronic injury. *Am J Pathol* 2010;176 :74-84.
20. Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5- lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1996;271 :24055-62.
21. Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthr Cartil* 2007;15 :1061-9.
22. Ma HL, Blanchet TJ, Peluso D, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. *Osteoarthr Cartil* 2007;15 :695-700.
23. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthr Cartil* 2010;18(Suppl 3) :S17-23.
24. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, Blati M, Fahmi H, Lussier B, et al. PPAR γ deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2015;74 :569-78.
25. Nebbaki SS, El Mansouri FE, Afif H, Kapoor M, Benderdour M, Pelletier JP, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors α , β , γ , and H- and L-prostaglandin D synthase during osteoarthritis in the spontaneous hartley Guinea pig and experimental dog models. *J Rheumatol* 2013;40 :877-90.

26. Conte FP, Menezes-de-Lima Jr O, Verri Jr WA, Cunha FQ, Penido C, Henriques MG. Lipoxin A(4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. *Br J Pharmacol* 2010;161 :911-24.
27. Fogh K, Hansen ES, Herlin T, Knudsen V, Henriksen TB, Ewald H, et al. 15-Hydroxy eicosatetraenoic acid (15-HETE) inhibits carrageenan-induced experimental arthritis and reduces synovial fluid leukotriene B4 (LTB4). *Prostaglandins* 1989;37 :213-28.
28. Zhang L, Zhang X, Wu P, Li H, Jin S, Zhou X, et al. BML-111, a lipoxin receptor agonist, modulates the immune response and reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Inflamm Res* 2008;57 :157-62.
29. Dufton N, Hannon R, Brancialeone V, Dalli J, Patel HB, Gray M, et al. Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2 : ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *J Immunol* 2010;184 :2611-9.
30. Devchand PR, Arita M, Hong S, Bannenberg G, Moussignac RL, Gronert K, et al. Human ALX receptor regulates neutrophil recruitment in transgenic mice : roles in inflammation and host defense. *FASEB J* 2003;17 :652-9.
31. Moreau M, Boileau C, Martel-Pelletier J, Brunet J, Laufer S, Pelletier JP. Licofelone reduces progression of structural changes in a canine model of osteoarthritis under curative conditions : effect on protease expression and activity. *J Rheumatol* 2006;33 :1176-83.
32. Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Bias P, Laufer S, Haraoui B, Choquette D, et al. Protective effects of licofelone, a 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibitor, versus naproxen on cartilage loss in knee osteoarthritis : a first multicentre clinical trial using quantitative MRI. *Ann Rheum Dis* 2009;68 :938-47.
33. Dunn HC, Ager RR, Baglietto-Vargas D, Cheng D, Kitazawa M, Cribbs DH, et al. Restoration of lipoxin A4 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology in the 3xTg-AD mouse model. *J Alzheimers Dis* 2015;43 :893e903.
34. Borgeson E, Johnson AM, Lee YS, Till A, Syed GH, Ali-Shah ST, et al. Lipoxin A4 attenuates obesity-induced adipose inflammation and associated liver and kidney disease. *Cell Metab* 2015;22 :125-37.
35. Das UN. Lipoxins as biomarkers of lupus and other inflammatory conditions. *Lipids Health Dis* 2011;10 :76.
36. Herlin T, Fogh K, Ewald H, Hansen ES, Knudsen VE, Holm I, et al. Changes in lipoxygenase products from synovial fluid in carrageenan induced arthritis in dogs. *APMIS* 1988;96 :601-4.
37. Gierman LM, Wopereis S, van El B, Verheij ER, Werff-van der Vat BJ, Bastiaansen-Jenniskens YM, et al. Metabolic profiling reveals differences in concentrations of oxylipins and

fatty acids secreted by the infrapatellar fat pad of donors with endstage osteoarthritis and normal donors. *Arthritis Rheum* 2013;65 :2606-14.

38. Naruhn S, Meissner W, Adhikary T, Kaddatz K, Klein T, Watzer B, et al. 15-hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist. *Mol Pharmacol* 2010;77 :171-84.

Figure legends

Figure 1. Expression of 12/15-LOX during the progression of DMM-induced OA and aging in WT mice. Knee joint sections from sham- and DMM-operated mice at 2, 4 or 8 weeks post-surgery (A) and from 3-, 6-, 9- and 15-month-old mice (B) (n = 5 in each group) were analyzed by immunohistochemistry for 12/15-LOX as described in the Materials and Methods section. Each image shown is one representative section selected from 20 sections of an experimental group (4 sections from each knee joint and 5 knee joints in each experimental group). (C, D) Percentage of chondrocytes expressing 12/15-LOX. Data are presented as median with interquartile range (n = 5 per group). The P-values were calculated using the Kruskale-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. (E, F) Expression of 12/15-LOX mRNA during the progression of DMM-induced OA and aging. Results are expressed as -fold change, considering 1 as the value of sham-operated (E) or 3-month-old (F) mice. Horizontal lines on the graph represent the mean of 2 independent experiments, each involving 5 mice per group.

Figure 2. Deletion of 12/15-LOX accelerates cartilage erosion with age. Coronal sections of whole knee joints from WT (A) and 12/15-LOX^{-/-} (B) mice at ages 3 months, 6 months, and 9 months (n = 6 mice per group) were prepared and stained with Safranin O-fast green to assess the integrity of articular cartilage. Each image shown is one representative section selected from 48 sections of an experimental group (8 sections from each knee joint and 6 knee joints in each experimental group). The representative section was selected based on the average score from each group. (Original magnification $\times 40$ in the upper panels (scale bars =500 μ m); and $\times 100$ in the lower panels (scale bars =200 μ m)). (C) Summed histologic scores of knee cartilage from WT mice (open symbols) and 12/15-LOX^{-/-} mice (filled symbols) at ages 3, 6, and 9 months as

determined using the OARSI scoring system. Data are presented as median with interquartile range (n = 6 per group). P values were determined by Mann-Whitney U test.

Figure 3. Deficiency of 12/15-LOX exacerbates cartilage erosion after DMM surgery.

Ten-week-old WT mice (A) and 12/15-LOX^{-/-} mice (B) (n = 8 mice per group) were subjected to DMM surgery. Knee joint samples were harvested 2, 4, or 8 weeks post-surgery, prepared and stained with Safranin O/fast green to assess the extent of articular cartilage degeneration. Each image shown is one representative section selected from 64 sections of an experimental group (8 sections from each knee joint and 8 knee joints in each experimental group). The representative section was selected based on the average score from each experimental group. (Original magnification x 40 in the upper panels (scale bars = 500 μm); and x 100 in the lower panels (scale bars = 200 μm)). (C) Summed histologic scores of knee cartilage from WT (open symbols) and 12/15-LOX^{-/-} (filled symbols) mice at 2, 4, and 8 weeks after DMM surgery, as determined using the OARSI scoring system. Data are presented as median with interquartile range (n = 8 per group). P values were determined by Mann-Whitney U test.

Figure 4. Expression of MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 in the knee joints of WT and 12/15-LOX^{-/-} mice at 3 and 6 months old. Knee joint sections from 3-month-old mice (n = 4 mice per genotype) and 6-month-old mice (n = 5 mice per genotype) were analyzed by immunohistochemistry for MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 (A) as described in the Materials and Methods section. Each image shown is one representative section selected from 16-20 sections of an experimental group (4 sections from each knee joint and 4-5 knee joints in each experimental group). (B) Percentage of chondrocytes expressing MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 in WT (open symbols) and 12/15-LOX^{-/-} (filled symbols) mice. Data are

presented as median with IQR of each group. P values were determined by Mann-Whitney U test. (C) Expression of MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 mRNA in WT (open bars) and 12/15-LOX^{-/-} mice (solid bars) at 3 and 6 months of age. The results are expressed as fold change considering 1 as the value of control (i.e., 3-month old WT mice). Horizontal lines on the graph represent the mean of 2 independent experiments, each involving 5 mice per group.

Figure 5. Expression of MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 in the knee joints of 12/15-LOX^{-/-} mice at 2 weeks post-DMM surgery. Knee joint sections from sham- (n = 4 per genotype) and DMM-operated (n = 5 per genotype) mice at 2 weeks post-surgery were analyzed by immunohistochemistry for MMP-13, ADAMTS5, iNOS and mPGES-1 (A) as described in the Materials and Methods section. Each image shown is one representative section selected from 16-20 sections of an experimental group (4 sections from each knee joint and 4-5 knee joints in each experimental group). (B) Percentage of chondrocytes expressing ADAMTS5, MMP-13, iNOS and mPGES-1. Data are presented as median with IQR of each group. P values were determined by Mann-Whitney U test. (C) Expression of ADAMTS5, MMP-13, iNOS and mPGES-1 mRNA in WT (open bars) and 12/15-LOX^{-/-} (solid bars) mice at 2 weeks post-sham or -DMM surgery. The results are expressed as fold change considering 1 as the value of control (i.e., sham-operated WT mice). Horizontal lines on the graph represent the mean of 2 independent experiments, each involving 5 mice per group.

Figure 6. 12/15-LOX metabolites prevent IL-1 α -induced inflammatory and catabolic responses in cultured cartilage explants. Femoral heads from 3- to 4-week-old WT mice were cultured as explants (6 femoral heads (3 mice) per well) in 24-well plates and were stimulated with 1 ng/ml IL-1 α in the absence or presence of 13-HODE (5 mM), 15-HETE (5 mM) and

LXA4 (0.5 mM) for 48 h. The activity of MMP-13 (Fluorescence 490, 520 nm) (A), and the levels of NO (B) and PGE₂, (C) in conditioned media were determined. Data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. *P < 0.05 compared with IL-1 α -treated cartilage.

Figure 7. LXA4 attenuated DMM-induced cartilage destruction. Ten-week-old WT mice were subjected to DMM (n = 14) or sham (n = 14) surgery. DMM-operated mice were intraperitoneally injected with either vehicle control (PBS) or LXA4 (5 mg/kg/day) (n = 7 mice per group) every day beginning 1 day after surgery, for 8 weeks. Sham operated mice also received LXA4 or vehicle control (n = 7 mice per group). Knee joints were collected and cartilage degradation was analyzed using Safranin O-fast green staining. (A) Representative images are shown. The representative section was selected based on the average score from each experimental group. (B) Summed histologic scores, as determined using the OARSI scoring system. Data are presented as median with IQR for each group. P values were determined by Mann-Whitney U test.

Supplements figures legends:

Suppl figure 1: Expression of C1,2C and VDIPEN in the knee joints of WT and 12/15-LOX^{-/-} mice at 3 and 6 months old. Knee joint sections from 3-, (n = 4 mice per genotype) and 6-month-old mice (n = 5 mice per genotype) were analyzed by immunohistochemistry for C1,2C and VDIPEN as described in the Materials and Methods section. Each image shown is one representative section selected from 16-20 sections of an experimental group (4 sections from each knee joint and 4-5 knee joints in each experimental group).

Suppl figure 2: Expression of C1,2C and VDIPEN in the knee joint of 12/15-LOX^{-/-} mice at 2 weeks post-DMM surgery. Knee joint sections from sham- (n = 4 per genotype) and DMM-operated (n = 5 genotype) mice at 2 weeks post-surgery were analyzed by immunohistochemistry for C1,2C and VDIPEN as described in the Materials and Methods section. Each image shown is one representative section from 16-20 sections of an experimental group (4 sections from each knee joint and 4-5 knee in each experimental group).

Figures

Figure 1 :

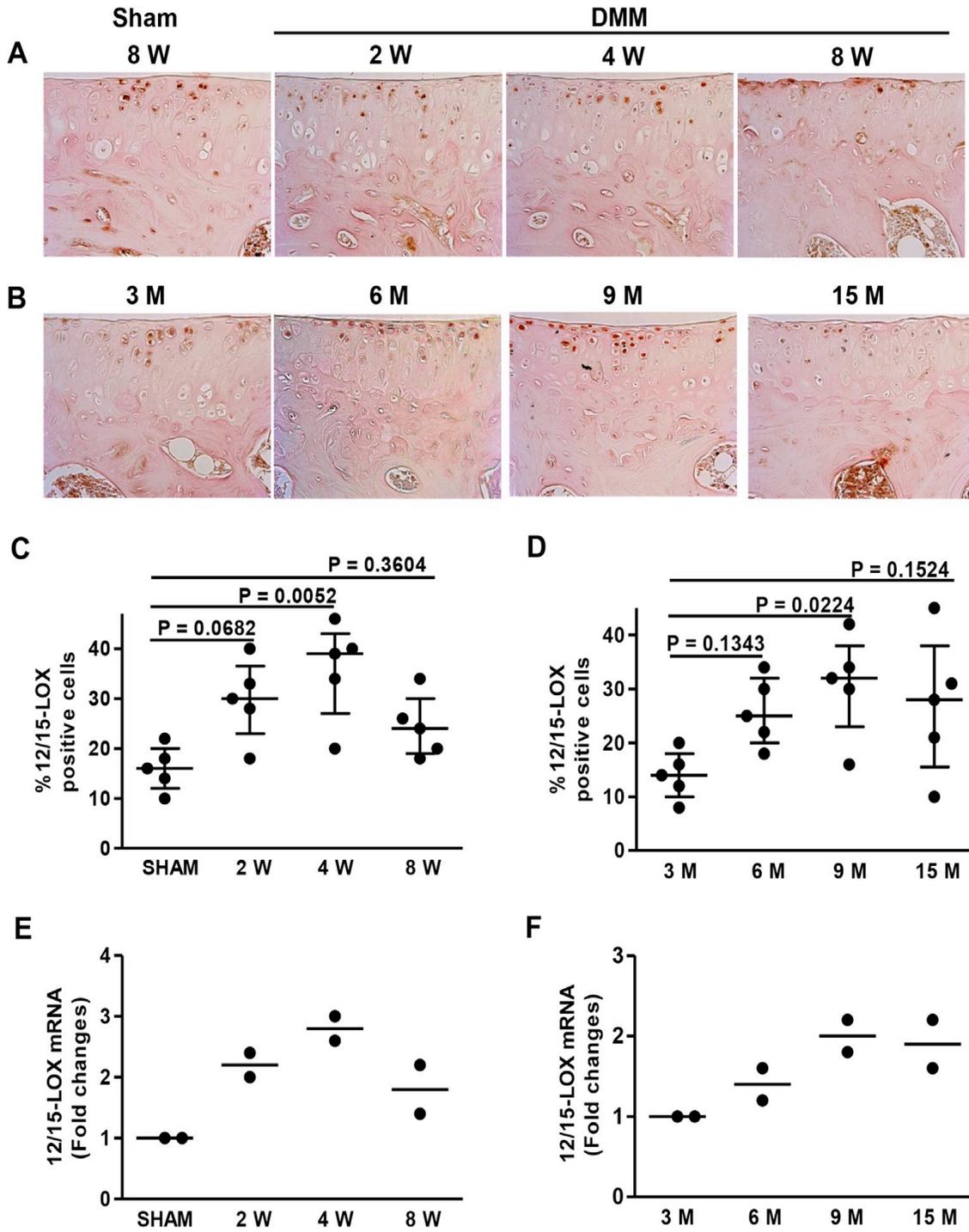


Figure 2 :

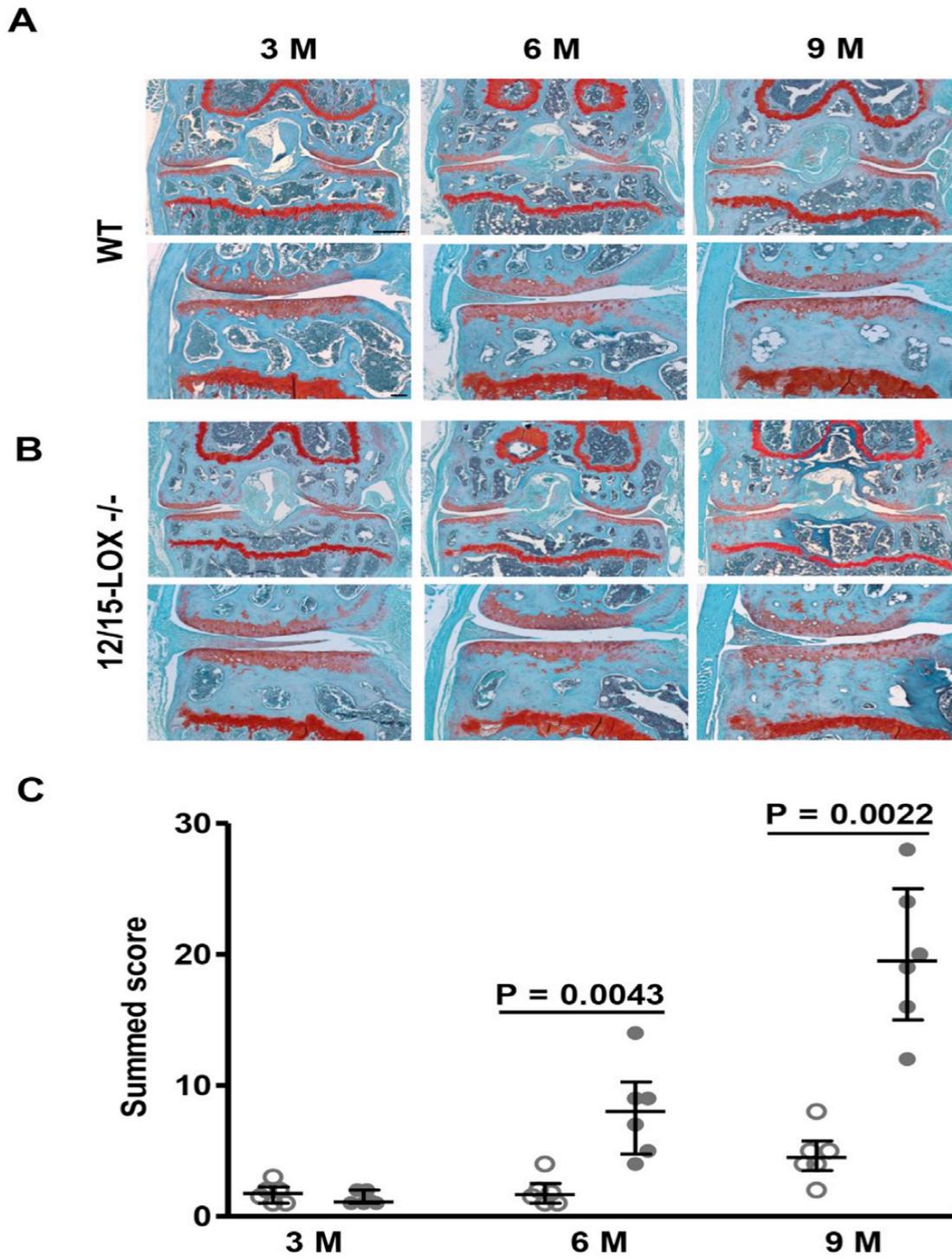


Figure 3 :

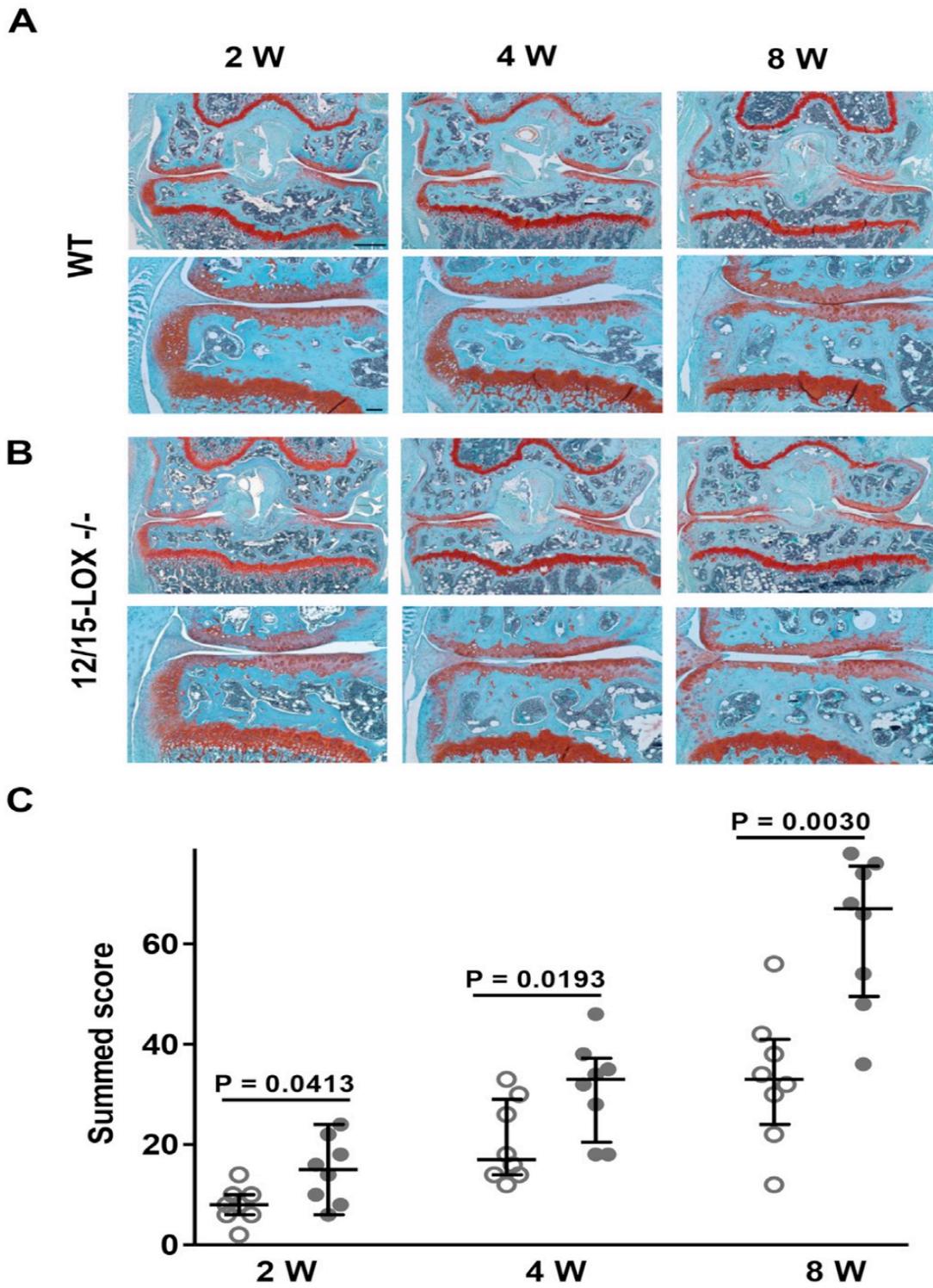


Figure 4 :

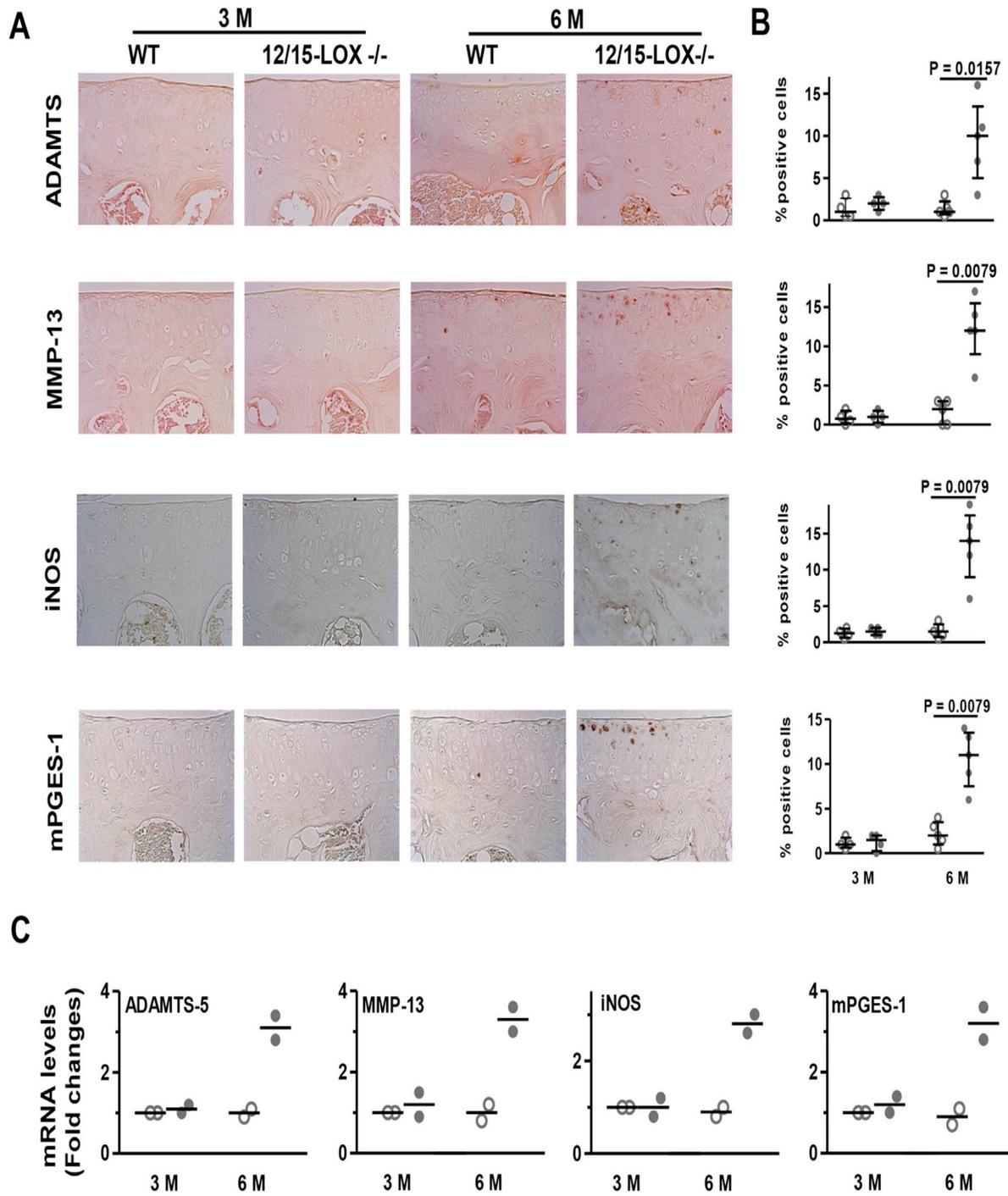


Figure 5 :

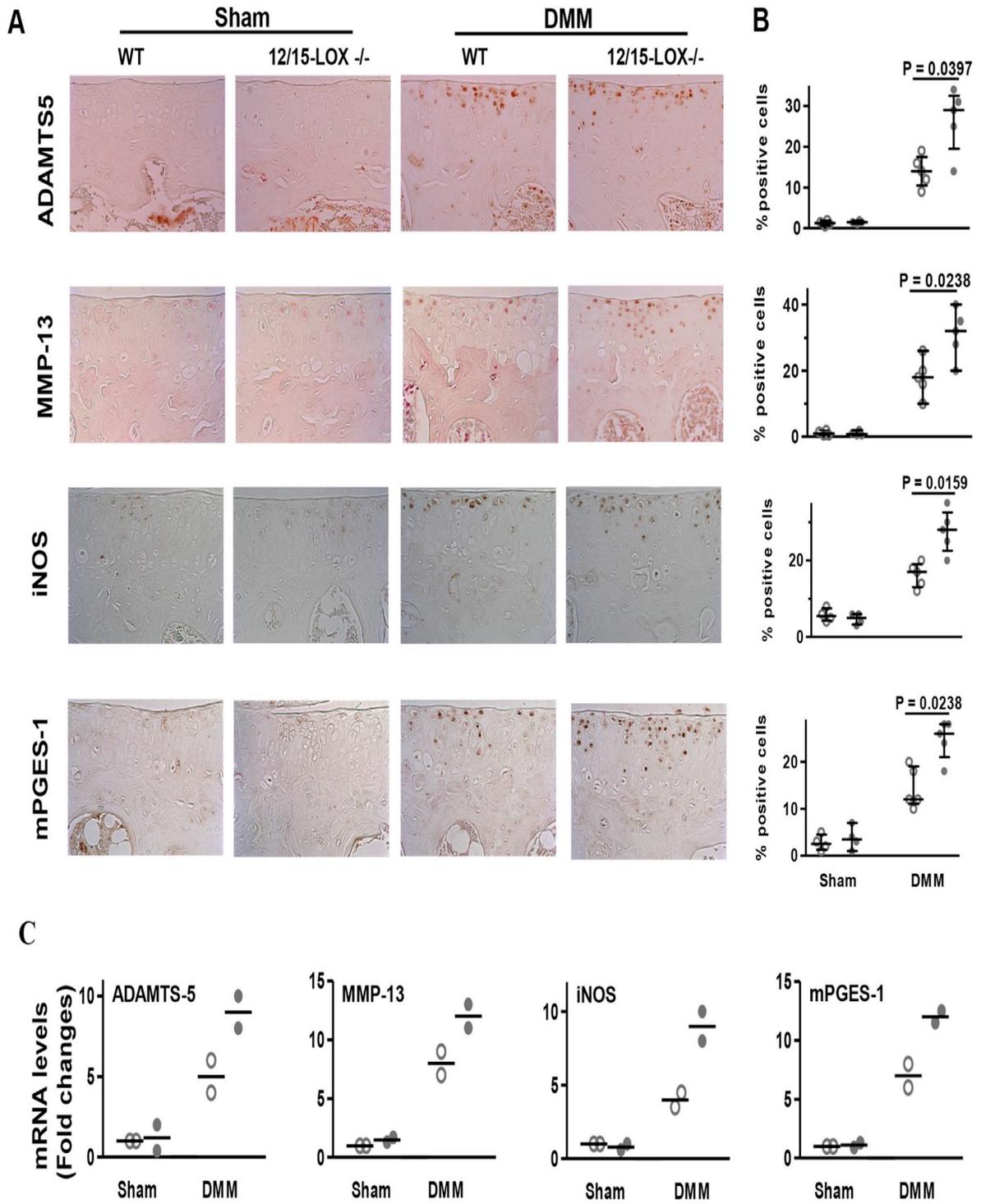


Figure 6 :

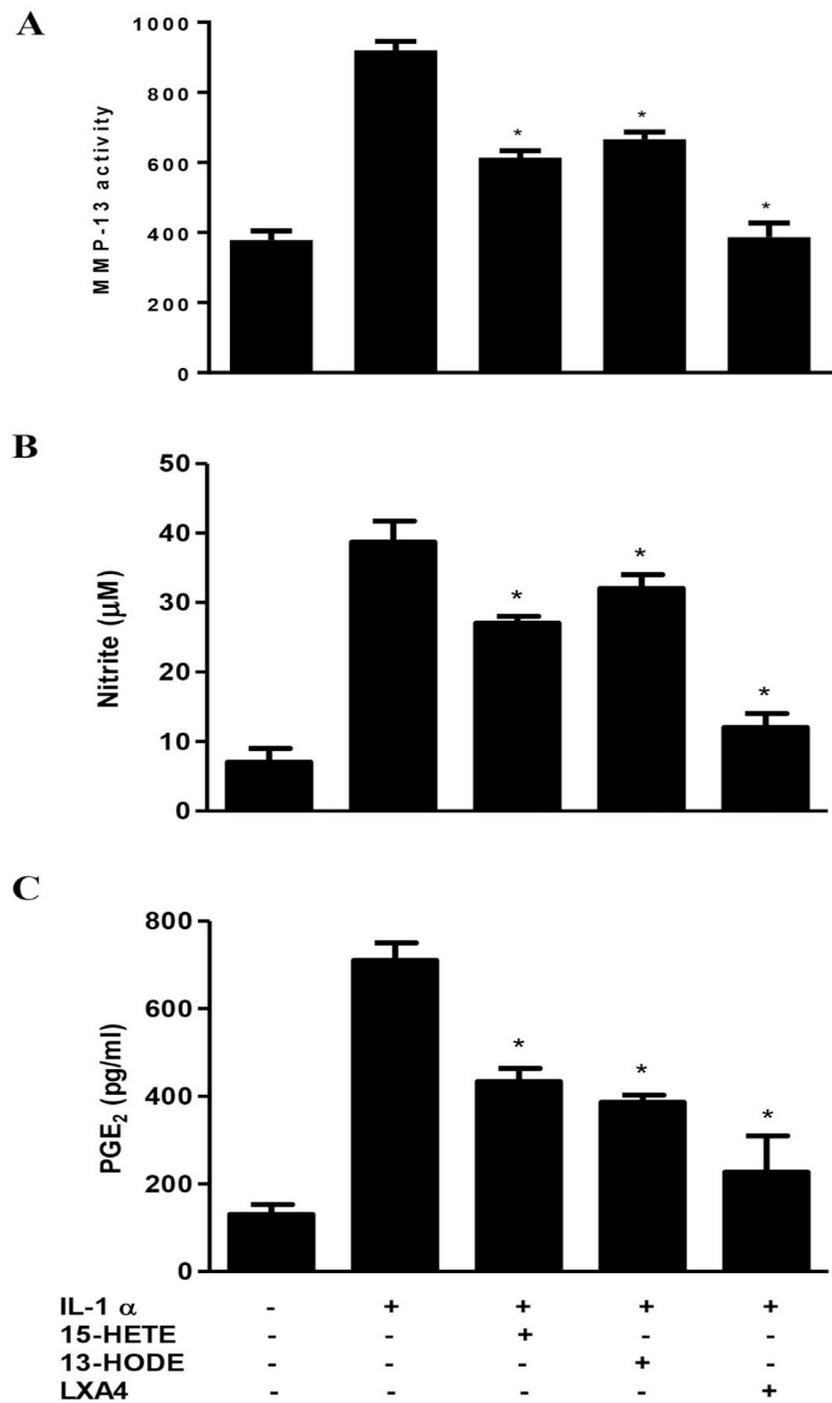
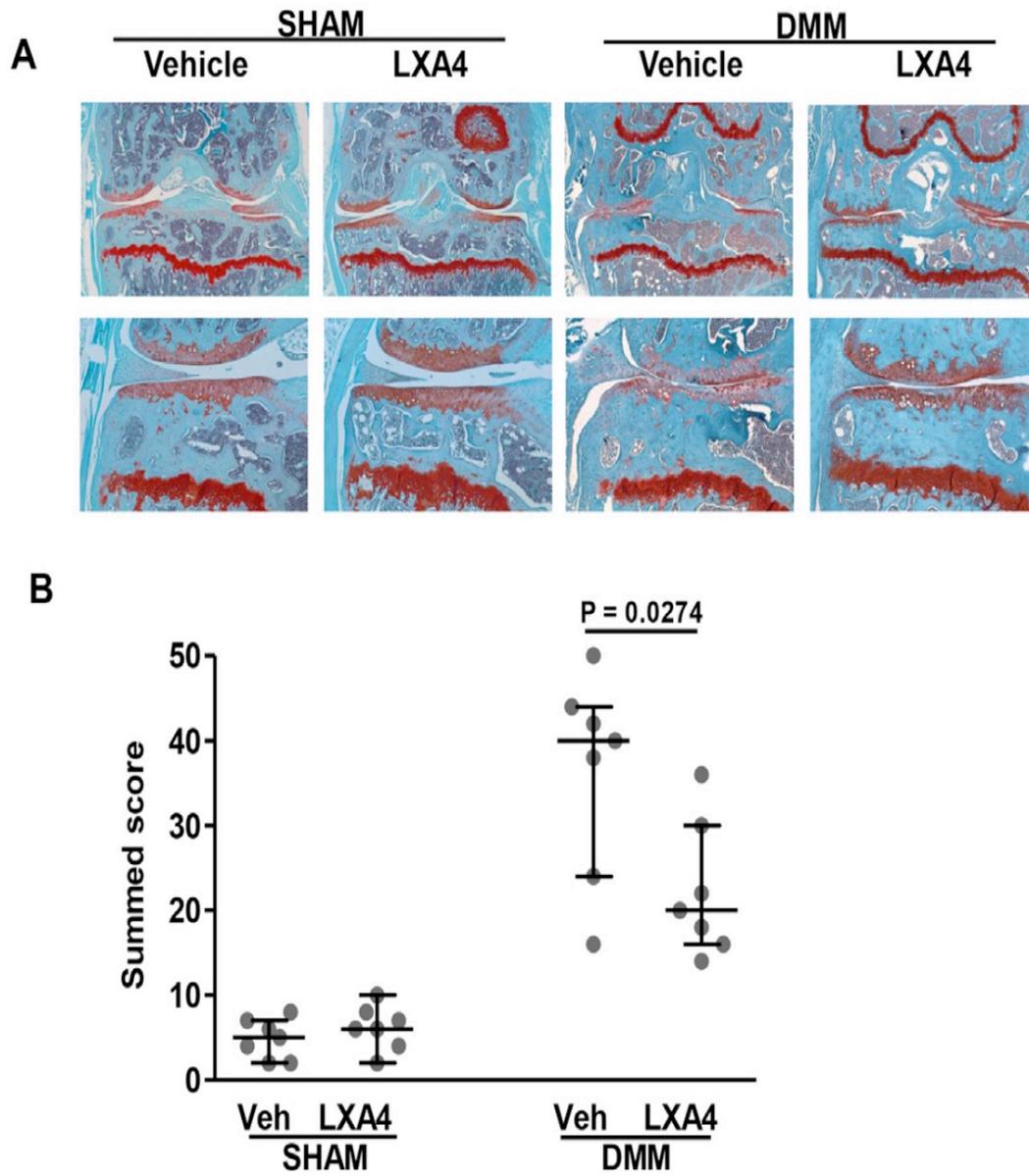
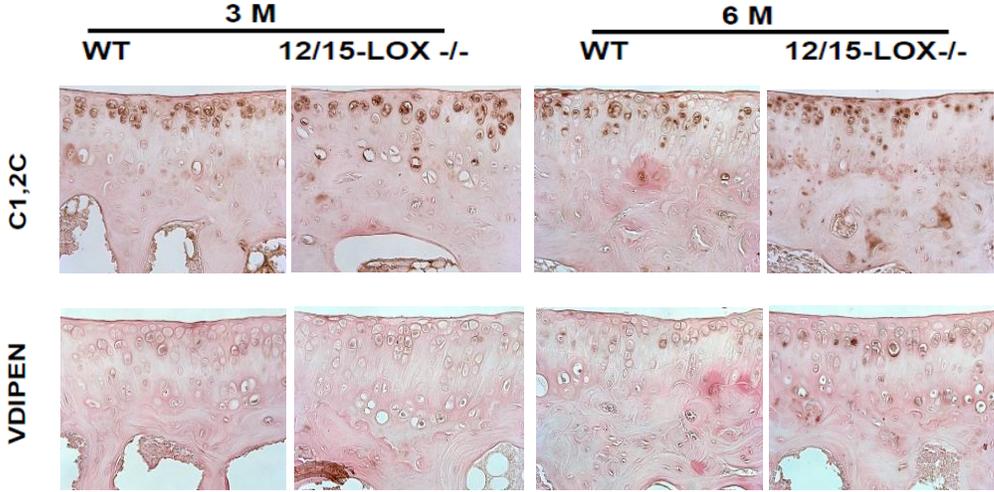


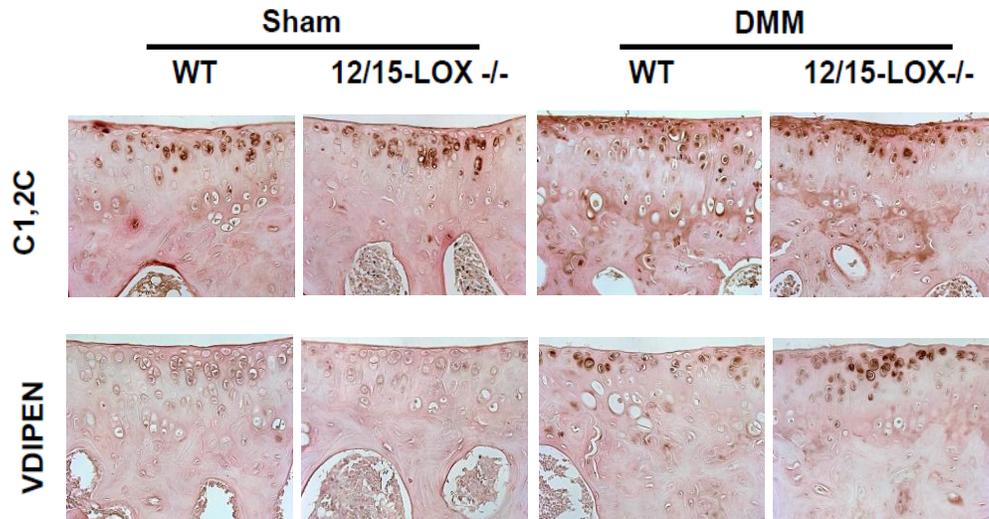
Figure 7 :



Supplement Figure 1 :



Supplement figure 2 :



Discussion

L'arthrose est connue comme étant la maladie la plus répandue au Canada et dans le monde. Elle se caractérise principalement par une dégradation du cartilage, l'inflammation de la membrane synoviale ainsi que le remodelage de l'os sous-chondral. Plusieurs facteurs peuvent initier l'arthrose et entraînent un déséquilibre dans le métabolisme via des mécanismes moléculaires moins compris. Il se produit donc un déséquilibre entre l'activité catabolique et anabolique qui conduit à une augmentation des facteurs procataboliques et pro-inflammatoires aux dépens des facteurs anaboliques et anti-inflammatoires. Certains processus physiologiques et pathophysiologiques, notamment les processus douloureux et inflammatoires sont contrôlés par les eicosanoïdes, tels que les prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes), les leucotriènes, les hepoxillines et les lipoxines. Ces eicosanoïdes synthétisés par les cyclooxygénases, par les lipoxygénases et par la voie du cytochrome P450, respectivement, sont impliqués dans l'OA. En effet, des études ont montré que les prostaglandines, plus spécifiquement la PGE₂ synthétisé par la PGE synthase, est impliquée dans l'inflammation et sa présence permet la synthèse des médiateurs inflammatoires et cataboliques qui entraînent la dégradation du cartilage. Par contre, des études de notre laboratoire ont montré que la délétion du récepteur (DP1) de la prostaglandine PGD₂ synthétisée par la L-PGDS, exacerbe la dégradation du cartilage accompagnée par une augmentation des expressions des protéases telles que la MMP-13 et l'ADAMTS-5 et des changements au niveau de l'os sous-chondral, démontrant ainsi l'effet anti-inflammatoire de la PGD₂ [82]. D'autre part, les leucotriènes sont également impliqués dans le sujet de l'inflammation, mais reste moins connues dans le sujet de l'OA. D'ailleurs, c'est pourquoi le sujet de ce mémoire concerne la voie des lipoxygénases et plus

spécifiquement la 12/15-LOX qui forme les leucotriènes, puisqu'il est également clair que la biosynthèse des médiateurs lipidiques peut représenter une cible thérapeutique pour l'arthrose.

Dans cette étude, nous avons porté un intérêt à la délétion du gène de la 12/15-LOX afin de mieux comprendre son effet sur l'état du cartilage des souris et ainsi examiner la progression de l'OA. Nous avons d'abord étudié l'expression de la 12/15-LOX durant la progression de l'OA induite par une instabilité suite à une microchirurgie par déstabilisation du ménisque médiale (DMM) et celle associée au vieillissement chez les souris WT.

L'augmentation de l'expression de la 12/15-LOX dans le cartilage au cours de l'arthrose associée au vieillissement et induite par la DMM

Dans le but d'investiguer l'implication de la 12/15-LOX dans la physiopathologie de l'arthrose, nous avons d'abord étudié son expression dans le cartilage. Les résultats de cette première étude ont montré qu'il y a une augmentation significative de l'expression de la 12/15-LOX dans le cartilage des genoux de souris WT durant l'arthrose associée à l'âge et induite par la DMM. Les analyses par immunohistochimie montrent qu'il y a une différence dans l'expression de la protéine dans le modèle chirurgical de l'arthrose et celui associé au vieillissement. Le pourcentage des cellules marquées positivement pour la 12/15-LOX tend à augmenter chez les souris n'ayant pas été opérées (SHAM) et âgées de 2 et 4 semaines post chirurgie. Par contre, le pourcentage diminue chez les souris âgées de 8 semaines post chirurgie. De l'autre côté, les chondrocytes des cartilages des jeunes souris âgées de 3, 6 et 9 mois expriment la même proportion de 12/15-LOX que celles des vieilles souris âgées de 15 mois. Ceci dit que le pourcentage des cellules marquées pour la 12/15-LOX est demeuré élevé au cours du vieillissement des souris. Une investigation de l'expression de la 12/15-LOX dans le cartilage des souris plus âgées que 15 mois sera un atout puisque cet âge représente un stade précoce de l'arthrose. Cette première étude a pour but d'analyser l'expression de la 12/15-LOX et a donc

permis de démontrer son implication dans la pathophysiologie de l'OA. En effet, la présence du gène de la 12/15-LOX chez les souris WT implique également la présence de ses métabolites anti-inflammatoires (15-HETE, 13-HODE et LXA4), puisque le gène est exprimé dans la cellule. Nous pouvons voir que l'expression de cette enzyme et ses métabolites offre une certaine protection pour le cartilage des souris âgées et opérées. Une étude a montré que l'expression de la 15-LOX chez le lapin améliorait l'inflammation et le dommage tissulaire [83]. En effet, le cartilage des souris WT dans le modèle associé à l'âge et dans le modèle chirurgical semble être en bonne condition et ne présente pas de dégradation. Ceci illustre son implication dans la pathogénèse de l'OA. Dans cette première étude, nous avons démontré que la protéine est exprimée dans le cartilage. Cependant, l'effet protecteur de la 12/15-LOX et ses métabolites pourrait être confirmé avec des souris déficientes pour le gène. La déficience du gène entraînera une diminution dans l'expression des médiateurs protecteurs de la 12/15-LOX et une augmentation de l'inflammation.

L'accélération du développement de l'arthrose associée au vieillissement et induite par instabilité chez les souris déficientes pour la 12/15-LOX

L'étude de l'expression de la 12/15-LOX dans le cartilage des souris WT a permis de démontrer une association entre l'OA et sa diminution. Ceci suggère alors l'investigation du rôle de la 12/15-LOX durant le développement de l'arthrose. En effet, la 12/15-LOX possède un rôle important dans l'OA puisque la déficience de ce gène exacerbe la dégradation du cartilage et conduit donc à l'accélération du développement de l'arthrose. L'apparence du cartilage articulaire des souris déficientes pour le gène de la 12/15-LOX dans les deux modèles utilisés correspondant au vieillissement et à l'instabilité a été examinée en histologie par une coloration à la Safranine-O. Celle-ci permet d'analyser la dégradation du cartilage ainsi que d'évaluer

l'intégrité du cartilage en utilisant le système d'OARSI. Les résultats obtenus montrent en premier temps que le cartilage articulaire des souris WT âgées de 3 mois, 6 mois et 9 mois est intact et en bonne condition, puisqu'il ne présente aucune perte de la Safranine-O. Par contre, le cartilage articulaire des souris déficientes pour la 12/15-LOX âgées de 6 mois représente une perte des protéoglycanes retrouvées dans la matrice extracellulaire reflétée par la perte de la Safranine-O. Cette perte est également accompagnée par certaines fibrillations ainsi qu'une surface irrégulière du cartilage. De plus, la dégradation du cartilage est plus prononcée chez les souris plus âgées de 9 mois. Chez les souris ayant une arthrose induite par déstabilisation du ménisque médiale, la dégradation du cartilage des souris déficientes pour la 12/15-LOX est plus prononcée à 2, 4 et 8 semaines suivant la DMM comparativement aux souris WT. Bref, ces résultats montrent que la déficience en ce gène permet l'exacerbation de la dégradation du cartilage articulaire dans les deux modèles de souris d'arthrose associée à l'âge et à l'instabilité induite par la DMM.

L'augmentation de l'expression des médiateurs cataboliques et inflammatoires ainsi que les produits de dégradation de la MEC chez les souris déficientes pour la 12/15-LOX

Des travaux récents de notre laboratoire ont démontré une régulation négative exprimée par une diminution de l'expression des métalloprotéases MMP-1 et MMP-13 qui était induite par le rôle chondroprotectif des 15-LOX-1 et 15-LOX2 (homologues humains de la 12/15-LOX) [67]. Étant donné que la dégradation du cartilage est causée par deux principales familles d'enzymes, soit MMPs et ADAMTS [30], l'investigation de l'expression des médiateurs cataboliques MMP13 et ADAMTs-5 a été effectuée afin de déterminer si l'accélération de la progression de l'OA chez les souris déficientes pour la 12/15-LOX est causée par l'augmentation de leur production. Les résultats de l'immunohistochimie montrent que ces deux enzymes sont

faiblement exprimées par les chondrocytes du cartilage des jeunes souris WT de 3M et 6M. Or, leur expression augmente dans le cartilage des souris déficientes pour la 12/15-LOX âgées de 6M. De l'autre côté, dans le modèle chirurgicale, l'expression de ces protéines est nulle dans le cartilage des souris n'ayant pas été opérées. Par contre, une augmentation significative de leur expression par les chondrocytes des cartilages des souris WT et déficientes pour la 12/15-LOX survient 2 semaines suivant la DMM. Il faut noter que le pourcentage des cellules marquées pour l'ADAMTS-5 et MMP13 est plus élevé chez les souris déficientes en 12/15-LOX. Les médiateurs inflammatoires sont également impliqués dans la pathogénèse de l'arthrose puisqu'ils augmentent l'expression des MMPs qui à leurs tours diminuent la synthèse du collagène et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire et conduit alors à une dégradation du cartilage [30].

Les gènes pro-inflammatoires analysés sont de l'iNOS et de mPGES-1 qui catalysent respectivement la biosynthèse des deux médiateurs proinflammatoires NO et PGE2 dans le cartilage. Les résultats de l'immunohistochimie montrent une augmentation du pourcentage des cellules marquées pour iNOS et mPGES-1 dans le cartilage des souris 12/15-LOX *-/-* âgées de 6 mois comparativement aux souris WT âgées de 3M. De même, dans le modèle de la DMM, il y a une augmentation de l'expression de ces deux médiateurs cataboliques par les chondrocytes du cartilage des souris 12/15-LOX *-/-* âgées de deux semaines après la chirurgie comparativement aux souris WT. De plus, les résultats obtenus par les analyses de PCR en temps réel, ont montré que dans le modèle de l'OA, la délétion de la 12/5-LOX est associée à une augmentation significative en ARNm pour MMP13, ADAMTS5, iNOS et m-PGES-1 chez les souris âgées de 6M et de deux semaines suivant la chirurgie plutôt que chez les souris WT. Ces résultats nous ont permis de conclure que la délétion du gène de la 12/15-LOX induit à l'augmentation de

l'expression de MMP-13, ADAMTS5, iNOS et mPGES-1, qui à leurs tours contribuent à la dégradation du cartilage.

En effet, aucune fibrillation n'est observée au niveau du cartilage des souris âgées de 3M WT et déficientes pour la 12/15-LOX. Par contre, chez celles âgées seulement de 6M et déficientes pour la 12/15-LOX, le cartilage présente des chondrocytes marquées de façon significative pour l'ADAMTS5, MMP13, iNOS et mPGES-1. De plus, leurs cartilages montrent des légères fissures qui sont également présentes dans le cartilage des souris WT, sans aucun marquage pour ces protéines. Ceci peut être expliqué par le fait que l'âge contribue au développement de l'OA [37]. Par contre, il est clair que le cartilage est plus abimé chez les souris déficientes pour la 12/15-LOX et âgées de 6M chez lesquelles les chondrocytes sont marquées pour ces protéines. Cette dégradation du cartilage plus importante s'explique alors par la délétion du gène de la 12/15-LOX ainsi que par vieillissement.

Les résultats précédents ont montré qu'il y a une augmentation de l'expression des médiateurs cataboliques MMP-13 et d'ADAMTS-5 par les chondrocytes, et ce au niveau du cartilage des souris déficientes pour la 12/15-LOX comparativement aux souris WT dans nos deux modèles. Étant donné que les MMP et les aggrecanases sont des enzymes impliquées dans la dégradation du cartilage au niveau de l'articulation [84], nous avons tenté d'analyser les produits de dégradation des composants majeurs de la matrice extracellulaire, soit le collagène et l'aggrecane. Il est connu que les chondrocytes articulaires expriment les collagénases MMP-1, 8, 13 et 14 qui font partie de la famille des métalloprotéinases. Elles sont impliquées dans le clivage spécifique du triple hélicoïdal du collagène type I et II en C-terminal. Ainsi cette dégradation du collagène est considérée comme étant un processus important dans la dégénération du cartilage durant l'OA [85]. De plus, il a démontré in vivo que le collagène type

II dans le cartilage articulaire est clivé par les MMP-13 en deux fragments de longueurs différentes $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{4}$. Les néoépitopes qui se retrouvent sur les fragments générés par les MMPs sont reconnues par des anticorps dirigés contre ces biomarqueurs de dégradation du collagène type I et II (C1,2C). Ceci veut donc dire que le C1,2C reconnaît le collagène type I et type II et il est considéré comme le néoépitope du clivage en position C-Terminal sur le fragment $\frac{3}{4}$ du collagène généré par les MMP-13 [86],[87]. De plus, les molécules d'aggrécane qui se retrouvent dans la matrice extracellulaire sont également clivées par les MMPs et les aggrécanasés et leurs produits de dégradation sont des néoépitopes en N-Terminal de VDIPEN et le NITEGE respectivement [23]. Ces néoépitopes d'aggrécane sont considérés comme étant des marqueurs sensibles et spécifiques d'une pathologie articulaire précoce [88]. Nous avons montré qu'il y a une augmentation de l'expression de C1, 2C et VDIPEN par le cartilage des souris 12/15-LOX (-/-) âgées de 6 mois comparativement aux cartilages des souris WT et celles âgées de 3 mois considérées comme des contrôles. Dans le modèle de la DMM, les cellules positivement marquées pour l'épitope C1,2C et VDIPEN sont retrouvées en plus grande proportion au niveau du cartilage des souris WT et 12/15-LOX(-/-) de 2 semaines post-chirurgie. Or, le marquage est plus prononcé chez les souris déficientes pour la 12/15-LOX. Ces résultats démontrent que la délétion du gène de la 12/15-LOX est impliquée dans l'augmentation de la dégénération de la matrice extracellulaire. Selon la littérature, le marquage pour les fragments d'aggrécane, VDIPEN et NITEGE, se retrouve spécifiquement dans la région superficielle du tissu montrant des fibrillations au niveau du cartilage. De plus, le marquage se retrouve plutôt au niveau de la surface des chondrocytes articulaires, mais également dans la matrice pericellulaire [88]. Nos résultats concordent bien avec la littérature puisqu'à la figure 2 en supplément, le cartilage des souris 12/15-LOX (-/-) présente des légères fibrillations et les chondrocytes qui s'y

trouvent expriment plus de VDIPEN comparativement au cartilage des souris WT et ainsi de manière pericellulaire. De plus, le fait que les chondrocytes dans le cartilage des souris du modèle de la DMM expriment en plus grande portion le C1,2C peut être un résultat représentatif puisque la DMM que les souris ont subite est une provocation de l'arthrose. D'ailleurs, certaines études ont démontré in vitro qu'il y a un niveau élevé de C1,2C produits par les collagénases dans les explants des cartilages arthrosiques [87]. Dans le modèle des souris associé au vieillissement, les chondrocytes du cartilage des souris âgées de 6 mois seulement présentent un marquage à l'épitope C1, 2C plus fort que chez les souris plus jeunes âgées de 3 mois. Le marquage devrait également être plus fort chez les souris plus âgées. Nos résultats de l'immunohistochimie suivent les résultats dans la littérature, puisqu'il a été démontré que des hauts niveaux des épitopes générés par les MMPs se retrouvent dans des extraits de cartilages articulaires humains arthrosiques et ceci augmente également avec l'âge [85].

L'effet inhibiteur des métabolites de la 12/15-LOX des réponses inflammatoires et cataboliques induites par l'IL- α dans des explants de cartilage.

La 12/15-LOX s'avère jouer un rôle important dans la pathogénèse de l'arthrose, puisque sa délétion conduit à la dégénération du cartilage ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes cataboliques et inflammatoires. Or, la 12/15-LOX produit des métabolites qui s'avèrent avoir des effets protecteurs. En effet, des études récentes de notre laboratoire ont montré que les métabolites (13-HODE et 15-HETE) de 15-LOX1 et 15-LOX2 (homologues humains de la 12/15-LOX) possèdent des effets anti-inflammatoires en atténuent l'expression des MMP-1 et MMP-13 induites par l'IL-1 β [67]. Ceci nous a conduit à explorer l'effet de ces métabolites ainsi que l'effet de la lipoxine A4 (LXA4) sur les réponses cataboliques et inflammatoires induites par l'IL-1 α dans les explants de cartilage. En effet, selon plusieurs études, la LXA4 est reconnue

pour ses propriétés anti-inflammatoires. Elle présente un rôle anti-inflammatoire contre les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires dans les articulations enflammées des patients qui souffrent d'arthrite [68]. De plus, elle joue également un rôle important dans d'autres maladies telles que le psoriasis. En effet, elle possède des effets protecteurs en diminuant les niveaux des cytokines inflammatoires *in vivo* [89]. Le traitement des explants de cartilage de souris WT avec l'IL-1 α en présence et en absence des métabolites de la 12/15-LOX (15-HETE, 13-HODE et LXA4) a montré un changement dans la réponse inflammatoire et catabolique, étant donné qu'il est connu que l'IL-1 augmente la synthèse du PGE₂ par stimulation de l'activité du gène de la mPGES-1 et régule à la hausse la production du NO par iNOS [90]. Les résultats ont montré qu'en absence des trois métabolites de la 12/15-LOX, les réponses basales inflammatoires et cataboliques sont maximales, illustrant la réponse normale des cellules en présence de l'IL-1 α . Cependant, il y a une diminution importante des quantités de PGE₂, NO et MMP13 induites par l'IL-1 α lors des traitements des explants de cartilage avec les trois métabolites de la 12/15-LOX. Les résultats ont également montré que les réponses cataboliques et inflammatoires ont été diminuées de façon plus marquée lors du traitement avec la LXA4. Ces résultats suggèrent donc que la LXA4 possède le meilleur effet inhibiteur des réponses cataboliques et inflammatoires. Il est possible que l'effet inhibiteur des métabolites de la 12/15-LOX et la diminution de la production des MMP-13 passe par la voie de PPAR γ -dépendent. En effet, le schéma représentatif de cette voie illustré par des travaux récents de notre laboratoire montre que l'interaction de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 avec son récepteur active la voie de signalisation MAP kinase ainsi que les facteurs de transcription qui activent l'expression des gènes de MMP-1 et MMP-13. Ces métalloprotéines conduisent à leur tour à la dégradation du cartilage. Cependant, les enzymes de 15-LOX convertissent l'acide arachidonique et l'acide linoléique en métabolites 15-

HETE et 13-HODE qui à leurs tours activent PPAR γ . L'activité des facteurs de transcription AP-1, NF- κ B et PEA3 est diminuée par le PPAR γ activé, ce qui conduit à l'inhibition de l'expression des gènes qui codent pour les MMP-1 et MMP-13. Voici le schéma représentant l'effet inhibiteur des métabolites de la 15-LOX sur l'expression des métalloprotéases MMP-1 et MMP-13 (figure 9).

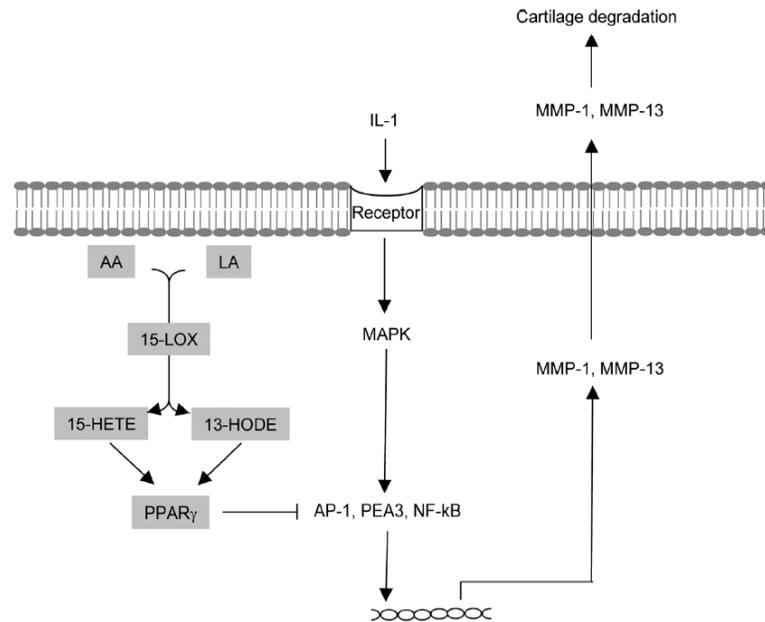


Figure 9 : Schéma montrant l'effet suppresseur des métabolites 15-HETE et 13-HODE de la 12/15-LOX via l'activation de la voie de PPAR γ sur l'expression des métalloprotéases. Schéma tiré de Chabane et al, [67].

Nos résultats démontrent que la déficience du gène de la 12/15-LOX aggrave la progression de l'arthrose et que ses principaux métabolites protègent des réponses cataboliques et inflammatoires. Ceci nous conduit à conclure que la diminution des niveaux des métabolites de la 12/15-LOX dans l'articulation contribue grandement au développement de l'arthrose. Notre hypothèse suggère que l'augmentation des niveaux des métabolites de la 12/15-LOX peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique et préventive pour l'arthrose.

L'effet protecteur de la LXA4 sur la dégradation du cartilage des souris de modèle DMM.

Les expériences précédentes *in vitro* ont montré que la LXA4 correspond à l'inhibiteur le plus efficace puisqu'elle diminue les réponses inflammatoires et cataboliques de façon plus prononcée comparativement aux deux autres métabolites. Notre hypothèse a été que la LXA4 a des effets protecteurs *in vivo*. D'ailleurs, des études ont montré que la LXA4 bloque les signaux proinflammatoires et contribue dans des certains mécanismes cellulaires tels que l'apoptose et la phagocytose des neutrophiles. De plus, selon la même étude, une augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoire et un dommage tissulaire a été montré suite à une diminution des niveaux de LXA4 [83]. En effet, les souris ayant reçus des injections péritonéales de LXA4 présentent un cartilage plutôt réparé avec moins de perte de la Safranine-O illustrée par la perte de protéoglycane ainsi que de fibrillation comparativement aux souris opérées traitées avec le PBS. De l'autre côté, le cartilage des souris non opérées traitées au PBS et à LXA4 n'ont montré aucun changement au niveau de la perte de la Safranine-O et la présence des fibrillations. Ceci nous permet de conclure que la LXA4 représente un métabolite important de la 12/15-LOX qui a la capacité d'atténuer la progression de l'OA en réparant le cartilage des souris *in vivo*.

Conclusion et perspectives

Il est clair que le gène de la 12/15-LOX est impliqué dans la pathogénèse de l'OA, puisque sa délétion a entraîné plusieurs complications qui conduisent toutes à l'exacerbation de la dégradation du cartilage des genoux des souris. Cette étude a permis d'étudier le rôle de la 12/15-LOX chez le modèle de la souris. Cependant, certaines limitations ont été retrouvées et représentent des éléments à améliorer dans les études subséquentes afin d'arriver à des conclusions plus significatives. En premier, les analyses ont été effectuées sur des jeunes souris qui subissaient la microchirurgie par déstabilisation du ménisque à l'âge de 10 semaines et sur celles âgées de 9 mois. Or, ces âges ne sont pas complètement représentatifs de l'arthrose chez l'humain, puisqu'elle est reconnue comme étant une maladie associée à l'âge. À cet effet, il sera essentiel d'étudier l'effet de la délétion du gène de la 12/15-LOX sur de modèles de souris d'âges plus avancés. Les résultats ont montré que les métabolites de la 12/15-LOX ont des effets protecteurs inflammatoires en diminuant les réponses inflammatoires et cataboliques chez les explants de cartilage de souris. Les prochaines études devraient être effectuées au niveau de cartilages arthrosiques et non arthrosiques de patients afin de pouvoir comparer les effets des métabolites de la 12/15-LOX au niveau des cartilages de souris versus humain. Or, cette partie pourrait présenter quelques difficultés, puisqu'il n'est pas facile de récolter le cartilage non arthrosique, car celui-ci provient des personnes décédées. Les récentes études de notre laboratoire ont montré que 15-HETE et 13-HODE induisent leurs effets anti-inflammatoires et cataboliques via la voie de PPAR γ . Néanmoins, il sera essentiel d'étudier plus en détail le mode d'action des métabolites de la 12/15-LOX, puisqu'ils peuvent induire leurs effets via d'autres voies dans la cellule telle que la voie de PPAR δ . De plus, les effets chondroprotecteurs du métabolite LXA4 ont été prouvés suite aux injections intrapéritonéales chez la souris. Ce

métabolite pourrait également être administré de façon orale afin de vérifier s'il pourrait éventuellement représenter une nouvelle stratégie de traitement pour l'arthrose. Les expériences futures peuvent, aussi inclure l'injection locale de LXA4 dans le genou des souris. Par contre, cette voie d'administration pourrait être problématique puisqu'elle pourrait être accompagnée par de l'inflammation suite à l'injection locale. Finalement, l'utilisation des autres modèles animaux tels que le chien, le rat et le cochon d'inde sera importante afin de pouvoir comparer l'effet de la délétion de la 12/15-LOX et le rôle de ses métabolites chez la souris et chez les autres modèles animaux.

Bibliographie

- [1] Y. Zhang et J. M. Jordan, « Epidemiology of Osteoarthritis », *Clin. Geriatr. Med.*, vol. 26, n° 3, p. 355-369, août 2010.
- [2] N. Arden et M. Nevitt, « Osteoarthritis: Epidemiology », *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 20, n° 1, p. 3-25, févr. 2006.
- [3] F. Berenbaum, « Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!) », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 21, n° 1, p. 16-21, janv. 2013.
- [4] X. L. Yuan *et al.*, « Bone–cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 22, n° 8, p. 1077-1089, août 2014.
- [5] A. Abhishek et M. Doherty, « Diagnosis and Clinical Presentation of Osteoarthritis », *Rheum. Dis. Clin. N. Am.*, vol. 39, n° 1, p. 45-66, févr. 2013.
- [6] J. Becerra, J. A. Andrades, E. Guerado, P. Zamora-Navas, J. M. López-Puertas, et A. H. Reddi, « Articular Cartilage: Structure and Regeneration », *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, n° 6, p. 617-627, déc. 2010.
- [7] M. T. Hannan, D. T. Felson, J. J. Anderson, A. Naimark, et W. B. Kannel, « Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women », *Arthritis Rheum.*, vol. 33, n° 4, p. 525-532, avr. 1990.
- [8] H. Dumond *et al.*, « Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 48, n° 11, p. 3118-3129, nov. 2003.
- [9] J. Bao, W. Chen, J. Feng, P. Hu, Z. Shi, et L. Wu, « Leptin plays a catabolic role on articular cartilage », *Mol. Biol. Rep.*, vol. 37, n° 7, p. 3265-3272, oct. 2010.
- [10] K. D. Allen et Y. M. Golightly, « State of the evidence »:, *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 27, n° 3, p. 276-283, mai 2015.
- [11] D. Chen *et al.*, « Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism », *Bone Res.*, vol. 5, p. 16044, janv. 2017.
- [12] A. M. Alshami, « Knee osteoarthritis related pain: a narrative review of diagnosis and treatment », *Int. J. Health Sci.*, vol. 8, n° 1, p. 85-104, janv. 2014.
- [13] S. McKenzie et A. Torkington, « Osteoarthritis - management options in general practice », *Aust. Fam. Physician*, vol. 39, n° 9, p. 622-625, sept. 2010.
- [14] K. M. Jordan *et al.*, « EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT) », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 62, n° 12, p. 1145-1155, déc. 2003.
- [15] P. Rao et E. E. Knaus, « Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond », *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 11, n° 2, p. 81, sept. 2008.
- [16] C. Mattia et F. Coluzzi, « COX-2 inhibitors: pharmacological data and adverse effects », *Minerva Anesthesiol.*, vol. 71, n° 7-8, p. 461-470, août 2005.
- [17] M. Yoshioka, C. Shimizu, F. L. Harwood, R. D. Coutts, et D. Amiel, « The effects of hyaluronan during the development of osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 5, n° 4, p. 251-260, juill. 1997.
- [18] M. C. Hochberg *et al.*, « American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee », *Arthritis Care Res.*, vol. 64, n° 4, p. 465-474, avr. 2012.

- [19] J. P. A. Arokoski, J. S. Jurvelin, U. Vaatainen, et H. J. Helminen, « Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading », *Scand. J. Med. Sci. Sports*, vol. 10, n° 4, p. 186-198, août 2000.
- [20] T. Iwanaga, M. Shikichi, H. Kitamura, H. Yanase, et K. Nozawa-Inoue, « Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint », *Arch. Histol. Cytol.*, vol. 63, n° 1, p. 17-31, mars 2000.
- [21] E. E. Hayek, C. Chauvet, et F. Rannou, « Cartilage articulaire, stress mécanique et arthrose », *SOFMER Actual. En Médecine Phys. En Réadapt.*, p. 12-15.
- [22] Z. Izadifar, X. Chen, et W. Kulyk, « Strategic Design and Fabrication of Engineered Scaffolds for Articular Cartilage Repair », *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, n° 4, p. 799-838, nov. 2012.
- [23] H. Nagase et M. Kashiwagi, « Aggrecanases and cartilage matrix degradation », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 5, n° 2, p. 94-103, 2003.
- [24] M. Maldonado et J. Nam, « The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis », *BioMed Res. Int.*, vol. 2013, p. 284873, 2013.
- [25] P. S. Burrage, K. S. Mix, et C. E. Brinckerhoff, « Matrix metalloproteinases: role in arthritis », *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 11, p. 529-543, janv. 2006.
- [26] X. Chevalier et P. Richette, « Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement », *EMC - Rhumatol.-Orthopédie*, vol. 2, n° 1, p. 41-58, janv. 2005.
- [27] J. A. Buckwalter, H. J. Mankin, et A. J. Grodzinsky, « Articular cartilage and osteoarthritis », *Instr. Course Lect.*, vol. 54, p. 465-480, 2005.
- [28] A. R. Poole *et al.*, « Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 61, n° Supplement 2, p. 78ii - 81, nov. 2002.
- [29] H. Akkiraju et A. Nohe, « Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration », *J. Dev. Biol.*, vol. 3, n° 4, p. 177-192, déc. 2015.
- [30] M. B. Goldring et K. B. Marcu, « Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 11, n° 3, p. 224, 2009.
- [31] L. J. Sandell et T. Aigner, « Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis », *Arthritis Res.*, vol. 3, n° 2, p. 107-113, 2001.
- [32] G. Meachim, F. N. Ghadially, et D. H. Collins, « REGRESSIVE CHANGES IN THE SUPERFICIAL LAYER OF HUMAN ARTICULAR CARTILAGE », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 24, p. 23-30, janv. 1965.
- [33] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, et S. Lavery, « Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair », *Clin. Orthop.*, n° 391 Suppl, p. S26-33, oct. 2001.
- [34] L. Zhang, J. Hu, et K. A. Athanasiou, « The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration », *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 37, n° 1-2, p. 1-57, 2009.
- [35] D. Eyre, « Collagen of articular cartilage », *Arthritis Res.*, vol. 4, n° 1, p. 30-35, 2002.
- [36] L. A. Setton, D. M. Elliott, et V. C. Mow, « Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 7, n° 1, p. 2-14, janv. 1999.
- [37] J. Martel-Pelletier, « Pathophysiology of osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 12, p. 31-33, 2004.

- [38] F. Nelson *et al.*, « Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis », *J. Clin. Invest.*, vol. 102, n° 12, p. 2115-2125, déc. 1998.
- [39] A.-M. Säämänen, H. Salminen, P. Dean, B. De Crombrughe, E. Vuorio, et M. P. Metsäranta, « Osteoarthritis-like lesions in transgenic mice harboring a small deletion mutation in type II collagen gene », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 8, n° 4, p. 248-257, juill. 2000.
- [40] K. Hu *et al.*, « Pathogenesis of osteoarthritis-like changes in the joints of mice deficient in type IX collagen », *Arthritis Rheum.*, vol. 54, n° 9, p. 2891-2900, sept. 2006.
- [41] S. Krasnokutsky, M. Attur, G. Palmer, J. Samuels, et S. B. Abramson, « Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 16, p. S1-S3, oct. 2008.
- [42] R. F. Loeser, « Molecular mechanisms of cartilage destruction: Mechanics, inflammatory mediators, and aging collide », *Arthritis Rheum.*, vol. 54, n° 5, p. 1357-1360, mai 2006.
- [43] L. A. Neuhold *et al.*, « Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 107, n° 1, p. 35-44, janv. 2001.
- [44] C. B. Little *et al.*, « Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development », *Arthritis Rheum.*, vol. 60, n° 12, p. 3723-3733, déc. 2009.
- [45] J. Bondeson, S. Wainwright, C. Hughes, et B. Caterson, « The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review », *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 26, n° 1, p. 139-145, févr. 2008.
- [46] G. C. Jones et G. P. Riley, « ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 7, n° 4, p. 160-169, 2005.
- [47] F. M. Rogerson *et al.*, « Evidence of a novel aggrecan-degrading activity in cartilage: Studies of mice deficient in both ADAMTS-4 and ADAMTS-5 », *Arthritis Rheum.*, vol. 58, n° 6, p. 1664-1673, juin 2008.
- [48] M. D. Tortorella, A.-M. Malfait, C. Deccico, et E. Arner, « The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 9, n° 6, p. 539-552, août 2001.
- [49] J. Martel-Pelletier, N. Alaaeddine, et J. P. Pelletier, « Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis », *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 4, p. D694-703, oct. 1999.
- [50] M. Kapoor, J. Martel-Pelletier, D. Lajeunesse, J.-P. Pelletier, et H. Fahmi, « Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis », *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 7, n° 1, p. 33-42, janv. 2011.
- [51] J. P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, et S. B. Abramson, « Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets », *Arthritis Rheum.*, vol. 44, n° 6, p. 1237-1247, juin 2001.
- [52] P. Wojdasiewicz, Ł. A. Poniatowski, et D. Szukiewicz, « The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis », *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, p. 1-19, 2014.
- [53] J.-P. Pelletier, « Rationale for the use of structure-modifying drugs and agents in the treatment of osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 12, p. 63-68, 2004.
- [54] R. Studer, D. Jaffurs, M. Stefanovic-Racic, P. D. Robbins, et C. H. Evans, « Nitric oxide in osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 7, n° 4, p. 377-379, juill. 1999.

- [55] S. Hashimoto, K. Takahashi, D. Amiel, R. D. Coutts, et M. Lotz, « Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 41, n° 7, p. 1266-1274, juill. 1998.
- [56] T. G. Brock et M. Peters-Golden, « Activation and Regulation of Cellular Eicosanoid Biosynthesis », *Sci. World J.*, vol. 7, p. 1273-1284, 2007.
- [57] M. Korotkova et P.-J. Jakobsson, « Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases », *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 10, n° 4, p. 229-241, févr. 2014.
- [58] F. R. Homaidan, I. Chakroun, H. A. Haidar, et M. E. El-Sabban, « Protein regulators of eicosanoid synthesis: role in inflammation », *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 3, n° 4, p. 467-484, août 2002.
- [59] D. Panigrahy, A. Kaipainen, E. R. Greene, et S. Huang, « Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer », *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, n° 4, p. 723-735, déc. 2010.
- [60] E. Ricciotti et G. A. FitzGerald, « Prostaglandins and Inflammation », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, n° 5, p. 986-1000, mai 2011.
- [61] C. S. Williams, M. Mann, et R. N. DuBois, « The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development », *Oncogene*, vol. 18, n° 55, p. 7908-7916, déc. 1999.
- [62] I. Siegle, T. Klein, J. T. Backman, J. G. Saal, R. M. Nüsing, et P. Fritz, « Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases », *Arthritis Rheum.*, vol. 41, n° 1, p. 122-129, janv. 1998.
- [63] H. Fahmi, « mPGES-1 as a novel target for arthritis », *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 16, n° 5, p. 623-627, sept. 2004.
- [64] Y. Chawengsub, K. M. Gauthier, et W. B. Campbell, « Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone », *AJP Heart Circ. Physiol.*, vol. 297, n° 2, p. H495-H507, août 2009.
- [65] D. J. Conrad, « The arachidonate 12/15 lipoxygenases: A review of tissue expression and biologic function », *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, vol. 17, n° 1-2, p. 71-89, mars 1999.
- [66] N. B. Janakiram, A. Mohammed, et C. V. Rao, « Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer », *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 30, n° 3-4, p. 507-523, déc. 2011.
- [67] N. Chabane *et al.*, « Human articular chondrocytes express 15-lipoxygenase-1 and -2: potential role in osteoarthritis », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 11, n° 2, p. R44, 2009.
- [68] A. Hashimoto *et al.*, « Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis », *J. Rheumatol.*, vol. 34, n° 11, p. 2144-2153, nov. 2007.
- [69] R. F. Klein, « Regulation of Bone Mass in Mice by the Lipoxygenase Gene Alox15 », *Science*, vol. 303, n° 5655, p. 229-232, janv. 2004.
- [70] T. Horn, K. Reddy Kakularam, M. Anton, C. Richter, P. Reddanna, et H. Kuhn, « Functional characterization of genetic enzyme variations in human lipoxygenases », *Redox Biol.*, vol. 1, p. 566-577, 2013.
- [71] H. Kühn et V. B. O'Donnell, « Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases », *Prog. Lipid Res.*, vol. 45, n° 4, p. 334-356, juill. 2006.
- [72] L. Nagy, P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen, et R. M. Evans, « Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma », *Cell*, vol. 93, n° 2, p. 229-240, avr. 1998.

- [73] M. Ricote, J. S. Welch, et C. K. Glass, « Regulation of Macrophage Gene Expression by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ », *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 54, n° 5-6, p. 275-280, sept. 2001.
- [74] A. D. Dobrian, D. C. Lieb, B. K. Cole, D. A. Taylor-Fishwick, S. K. Chakrabarti, et J. L. Nadler, « Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases », *Prog. Lipid Res.*, vol. 50, n° 1, p. 115-131, janv. 2011.
- [75] B. Samuelsson, S. Dahlen, J. Lindgren, C. Rouzer, et C. Serhan, « Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects », *Science*, vol. 237, n° 4819, p. 1171-1176, sept. 1987.
- [76] L. Habouri *et al.*, « Deletion of 12/15-lipoxygenase accelerates the development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 25, n° 10, p. 1719-1728, oct. 2017.
- [77] C. N. Serhan *et al.*, « Reduced Inflammation and Tissue Damage in Transgenic Rabbits Overexpressing 15-Lipoxygenase and Endogenous Anti-inflammatory Lipid Mediators », *J. Immunol.*, vol. 171, n° 12, p. 6856-6865, déc. 2003.
- [78] J. Shen *et al.*, « Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development », *J. Clin. Invest.*, vol. 98, n° 10, p. 2201-2208, nov. 1996.
- [79] K. A. Munger *et al.*, « Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n° 23, p. 13375-13380, nov. 1999.
- [80] A. J. Leedom, A. B. Sullivan, B. Dong, D. Lau, et K. Gronert, « Endogenous LXA4 Circuits Are Determinants of Pathological Angiogenesis in Response to Chronic Injury », *Am. J. Pathol.*, vol. 176, n° 1, p. 74-84, janv. 2010.
- [81] M. R. Emerson et S. M. LeVine, « Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15-lipoxygenase or 5-lipoxygenase », *Brain Res.*, vol. 1021, n° 1, p. 140-145, sept. 2004.
- [82] Y. Ouhaddi *et al.*, « Exacerbation of Aging-Associated and Instability-Induced Murine Osteoarthritis With Deletion of D Prostanoid Receptor 1, a Prostaglandin D₂ Receptor: DP1 IN AGING-ASSOCIATED AND INSTABILITY-INDUCED OA », *Arthritis Rheumatol.*, vol. 69, n° 9, p. 1784-1795, sept. 2017.
- [83] G. Kronke *et al.*, « 12/15-Lipoxygenase Counteracts Inflammation and Tissue Damage in Arthritis », *J. Immunol.*, vol. 183, n° 5, p. 3383-3389, sept. 2009.
- [84] M. W. Lark *et al.*, « Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. », *J. Clin. Invest.*, vol. 100, n° 1, p. 93-106, juill. 1997.
- [85] V. M. Dejica *et al.*, « Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 14, n° 3, p. R113, mai 2012.
- [86] L. G. Ameye, M. Deberg, M. Oliveira, A. Labasse, J. M. Aeschlimann, et Y. Henrotin, « The chemical biomarkers C2C, Coll2-1, and Coll2-1NO2 provide complementary information on type II collagen catabolism in healthy and osteoarthritic mice », *Arthritis Rheum.*, vol. 56, n° 10, p. 3336-3346, oct. 2007.
- [87] J. D. Birmingham, V. Vilim, et V. B. Kraus, « Collagen biomarkers for arthritis applications », *Biomark. Insights*, vol. 1, p. 61-76, févr. 2007.

- [88] I. I. Singer *et al.*, « Aggrecanase and metalloproteinase-specific aggrecan neo-epitopes are induced in the articular cartilage of mice with collagen II-induced arthritis », *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 5, n° 6, p. 407-418, nov. 1997.
- [89] X. Liu *et al.*, « Lipoxin A4 and its analog suppress inflammation by modulating HMGB1 translocation and expression in psoriasis », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, déc. 2017.
- [90] M. B. Goldring et M. Otero, « Inflammation in osteoarthritis »:, *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 23, n° 5, p. 471-478, sept. 2011.