

2M11.2966.10

Université de Montréal

L'étude du rôle de la leukotriène B₄ dans le fonctionnement anormal des ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques : effet de l'inhibition des cyclooxygénases et/ou de la 5-lipoxygénase.

Par

Yosabeth Paredes

Programme des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître(ès) Sciences (M.Sc)

En Sciences Biomédicales

Mars, 2002

© Yosabeth Paredes



W

4

U58

2002

V.072

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce Mémoire est intitulé:

L'étude du rôle de la leukotriène B₄ dans le fonctionnement anormal des ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques : effet de l'inhibition des cyclooxygénases et/ou de la 5-lipoxygénase.

Présenté par:
Yosabeth Paredes

Programme des Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury:	Dr John Di Battista
Directeur de recherche:	Dr Daniel Lajeunesse
Membre du jury:	Dr Julio Fernandes

SOMMAIRE

L'arthrose est une maladie articulaire dégénérative très répandue chez les personnes âgées et se caractérise par une perte du cartilage articulaire. La progression de cette maladie n'affecte pas seulement le cartilage articulaire mais implique l'articulation complète incluant l'os sous-chondral, les ligaments, la capsule, la membrane synoviale et les muscles périarticulaires. Ultérieurement, le cartilage articulaire se dégrade avec des fibrillations, des fissures, des ulcérations et une perte complète de l'épaississement de la surface articulaire. L'étiologie de cette maladie demeure encore inconnue de nos jours. En effet, jusqu'à présent le consensus voulait que l'arthrose commence par la dégénérescence du cartilage articulaire ce qui conduisait ensuite à la sclérose osseuse de l'os sous-chondral. Par contre, récemment une nouvelle hypothèse a été proposée dans laquelle l'épaississement de l'os sous-chondral précéderait la dégénération du cartilage dans l'arthrose. Notre laboratoire est un des premiers à analyser la physiologie cellulaire des ostéoblastes de l'os sous-chondral arthrosique et à examiner si ce tissu joue un rôle dans l'initiation et/ou la progression de l'arthrose.

Dans le présent travail, nous avons étudié le rôle potentiel des prostaglandines (PGE_2) et des leucotriènes (LTB_4) produites par les ostéoblastes de l'os sous-chondral des patients arthrosiques. Notre approche a consisté à utiliser un inhibiteur double des cyclooxygénases (COX) et de la 5-lipoxygénase (5-LO), la licofénone, pour évaluer la production de PGE_2 et de LTB_4 , et ainsi que pour déterminer le rôle de ces

eicosanoïdes dans les ostéoblastes. Nos résultats ont indiqué la synthèse de LTB_4 par les ostéoblastes et en plus nous avons démontré que le niveau de LTB_4 dans les ostéoblastes arthrosiques est plus élevé que chez les normaux. La production d'ostéocalcine et de phosphatase alcaline par les ostéoblastes OA ont aussi été modifiées en présence du licofélone. En effet, de manière dose-dépendante la licofélone augmente l'activité de l'alcaline phosphatase mais diminue la sécrétion de l'ostéocalcine. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des COXs (NS-398) ou de la 5-lipoxygénase (BayX-1005) a démontré que seule la production de LTB_4 modulait ces activités, démontrant un rôle clé de l'inhibition des leukotriènes dans les ostéoblastes OA. L'addition exogène de LTB_4 reproduit ces effets dans les ostéoblastes normaux. Sachant que le LTB_4 produit des effets secondaires très nuisibles et qu'il cause des dommages gastriques très importants nous avons, d'autre part, étudié si une inhibition chronique des COXs produisait un court-circuit vers cet eicosanoïde. En effet, une inhibition chronique de la synthèse des prostaglandines par le NS-398 a produit un court-circuit vers les leukotriènes. Ceci pourrait suggérer qu'une inhibition à long terme de la COX-2 telle que préconisée actuellement en clinique pourrait s'avérer nuisible pour la progression de l'OA; ainsi un inhibiteur double comme la licofélone est avantageux. D'autre part, pour déterminer à quel niveau de la production de LTB_4 le NS-398 intervenait, nous avons effectué des expériences de RT-PCR pour détecter le niveau de la 5-LO et de la FLAP, les deux enzymes responsables de la synthèse des leukotriènes. Le niveau de la 5-LO ne change pas mais celui de la FLAP est affecté par une inhibition chronique

avec le NS-398. Ainsi la FLAP serait le facteur le plus important de la régulation de la synthèse des leukotriènes dans les ostéoblastes.

En conclusion, la licofénone a démontré qu'il était capable de modifier deux importants biomarqueurs pour le remodelage osseux et la minéralisation via son inhibition sur la synthèse du LTB₄ et non du PGE₂.

Mots clés :

Arthrose, licofénone, LTB₄, PGE₂, ostéocalcine, phosphatase alcaline, ostéoblaste, os sous-chondral, FLAP, AINS.

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is a well-known disease that is part of the aging process and also one of the most common diseases among mammals. The disease process not only affects the articular cartilage, but also involves the entire joint, including the subchondral bone, ligaments, capsule, synovial membrane, and periarticular muscles. Ultimately, the articular cartilage degenerates with fibrillation, fissures, ulceration, and full thickness loss of the joint surface. Until recently, it was believed that the earliest change in OA was the fibrillation or disruption of the articular cartilage which lead to different alterations of the subchondral bone. Lately, some investigators have postulated that stiffening of subchondral bone precedes and causes articular cartilage degeneration, and this stiffening is also required for the progression of this degeneration. Our laboratory agrees with the last theory and is one of the first to analyze the metabolism of OA subchondral bone osteoblasts.

The present research was based on the investigation of licofelone, a new drug used in the treatment of inflammatory diseases such as osteoarthritis. Compared to other conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) that only targets cyclooxygenase (COX), licofelone, a dual inhibitor of COX and 5-lipoxygenase (5-LO) is more efficient and produces less side effects. Our study tested the effect of licofelone on the production of leukotriene B₄ (LTB₄) and prostaglandin E₂ (PGE₂) by subchondral osteoblasts from osteoarthritis patients and normal individuals. We also tested the effect of licofelone on

alkaline phosphatase activity and osteocalcin release by OA subchondral osteoblasts, two key biomarkers which are altered in OA subjects. To the best of our knowledge, the synthesis of LTB₄ by osteoblast cells *in vitro* has not been demonstrated prior to our studies. Our laboratory is the first to show the presence of this metabolite in osteoblasts. Furthermore, we demonstrated that licofelone inhibits the endogenous *in vitro* production of both LTB₄ and PGE₂ by OA osteoblast at similar levels. The results obtained with licofelone on biomarkers of osteoblasts were also interesting. We showed that licofelone inhibited osteocalcin secretion via its inhibition of LTB₄ but not its inhibition of PGE₂ synthesis. In contrast, licofelone was able to stimulate alkaline phosphatase activity and this effect was also due to the inhibition of LTB₄. Moreover, the addition of exogenous LTB₄ inhibits alkaline phosphatase activity in OA osteoblasts. Likewise, the addition of exogenous LTB₄ reproduced the same effects on normal osteoblasts. These results suggest that the effect of licofelone on alkaline phosphatase activity and osteocalcin release is mediated by leukotrienes. The possibility to produce a shunt towards leukotrienes by inhibiting prostaglandin synthesis was tested directly with OA osteoblasts, since the production of leukotrienes is potentially more harmful than the production of prostaglandin for the inflammatory process. Using a preferential inhibitor (NS-398) of COX-2 we produced a chronic inhibition of this enzyme which led to a shunt to leukotrienes, indicating that long-term inhibition of prostaglandin synthesis can lead to an actual shunt *in vitro* in osteoblasts. Hence, the

utilization of a dual inhibitor compared to conventional NSAIDs seems preferable for the treatment of OA patients.

To conclude, licofelone was shown to be able to modify two important biomarkers for bone remodeling and mineralization via its inhibition of LTB₄ not PGE₂ synthesis.

Key words:

Osteoarthritis, licofelone, LTB₄, PGE₂, osteocalcin, alkaline phosphatase, osteoblast, subchondral bone, FLAP, NSAIDs.

TABLE DES MATIÈRES

PAGES TITRES.....	I
SOMMAIRE FRANÇAIS.....	III
SOMMAIRE ANGLAIS.....	VI
TABLE DE MATIÈRES.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIV
DÉDICACE.....	XVII
REMERCIEMENTS.....	XVIII
A. INTRODUCTION.....	1
I. L'arthrose.....	3
I.1. La pathologie.....	4
I.2. L'épidémiologie.....	7
I.3. Les facteurs de risques pour le développement de l'OA.....	8
I.3.1. L'obésité.....	8
I.3.2. L'activité physique et l'occupation.....	10
I.3.3. La génétique.....	11
II. Le tissu cartilagineux.....	12
II.1. Le cartilage normal.....	13
II.2. Le cartilage arthrosique.....	14

III. Le tissu osseux.....	16
III.1. L'os cortical ou compact.....	18
III.2. L'os trabéculaire	20
IV. Le remodelage osseux.....	21
IV.1. L'ostéoblaste.....	23
IV.1.1. Le collagène.....	25
IV.1.2. La phosphatase alcaline.....	26
IV.1.3. L'ostéocalcine.....	28
IV.2. L'ostéoclaste.....	29
IV.3. La régulation hormonale du remodelage osseux.....	33
IV.3.1. Hormone parathyroïdienne.....	33
IV.3.2. La vitamine D.....	34
IV.3.3. Les facteurs de croissance et les cytokines.....	37
V. Le tissu osseux arthrosique.....	39
V.1. L'os sous-chondral arthrosique.....	39
V.2. La biochimie de l'os arthrosique.....	41
VI. Les eicosanoïdes.....	45
VI.1. L'acide arachidonique.....	45
VI.2. Les prostaglandines.....	46
VI.2.1. La COX-1 et la COX-2.....	47
VI.3. Les leukotriènes.....	50
VI.3.1. La 5-lipoxygénase.....	51

VI.3.2. Le LTB ₄	53
VII. Les anti-inflammatoires.....	55
VII.1. Les effets secondaires des AINS.....	56
VII.2. Les inhibiteurs doubles.....	58
VII. Hypothèse de recherche.....	62
B. MANUSCRIT :	
STUDY OF THE ROLE OF LEUKOTRIENE B ₄ IN ABNORMAL FUNCTION OF HUMAN SUBCHONDRAL OSTEOARTHRITIC OSTEOBLASTS : effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition.....	65
C. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	104
D. DISCUSSION	107
E. CONCLUSION	121
F. RÉFÉRENCES	124

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Le genou arthrosique.....	6
Figure 2 :	Les parties d'un os long.....	17
Figure 3 :	Système de Havers dans un os compact.....	19
Figure 4 :	Les différents types des cellules osseuses.....	22
Figure 5 :	Bipolarité morphologique et fonctionnelle de l'ostéoclaste.....	31
Figure 6 :	Biosynthèse de la vitamine D ₃	36
Figure 7 :	Biosynthèse des prostaglandines.....	48
Figure 8 :	Biosynthèse des leukotriènes.....	52
Figure 9 :	Mécanisme d'inhibition des eicosanoïdes par la licofélone.....	59

Manuscrit :

Figure 1 :	Relationship between the levels of LTB ₄ and PGE ₂ by human OA and normal subchondral osteoblasts.....	94
Figure 2 :	Effect of licofelone on LTB ₄ and PGE ₂ production.....	95
Figure 3 :	Effect of licofelone on alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion.....	97
Figure 4 :	Effect of exogenous addition of LTB ₄ on alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion by OA subchondral osteoblasts	99
Figure 5 :	Effect of exogenous addition of LTB ₄ on alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion by normal human subchondral osteoblasts.....	101

Figure 6 : Western blot analysis of leukotriene receptor BLT1 in normal
and OA osteoblasts.....103

Résultats supplémentaires :

Figure R.S.1.....105

Figure R.S.2.....106

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.A.	Acide arachidonique
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BGP	Bone GLA-protein
CT	Calcitonine
CSFs	Facteurs stimulateurs de colonies
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ cytosolique
COX-1	Cyclooxygénase 1
COX-2	Cyclooxygénase 2
ET-1	Endothéline-1
EETs	Acide epoxyeicosatriénoïque
FLAP	5-Lipoxygenase associated protein
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
GBF	Filtration glomérulaire rénale
GH	Hormone de croissance
GPCR	Récepteur couplé à une protéine G
5-HPETE	Acide 5-Hydropéroxyeicosatétraénoïque
HLA	Human lymphocyte antigen
ILs	Interleukines
IGF-1	Facteur de croissance insulinique de type-1

IGFBP	Protéine de liaison IGF
5-LO	5-Lipoxygénase
LTA ₄	Leukotriène de type A ₄
LTB ₄	Leukotriène de type B ₄
LTC ₄	Leukotriène de type C ₄
LTD ₄	Leukotriène de type D ₄
LTs	Leukotriènes
LXs	Lipoxines
NHANESI	National health and nutrition examination survey I
MMP	Métalloprotéinase matricielle
OA	Arthrose
OPG	Osteoprotegerin
PAF	Facteur d'activation des plaquettes
PAI	Inhibiteur de l'activateur de plasminogène
PDGFs	Facteurs de croissance plaquettaires
PGs	Prostaglandines
PGE ₂	Prostaglandine de type E ₂
PGHS	Prostaglandine endoperoxyde H synthase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPAR α	Peroxisome Proliferation Activated Receptors
PTH	Hormone parathyroïdienne
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
RBF	Flux sanguin rénale

RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
sPA ₂	Phospholipase A ₂ secrétée
TGF- β	Transforming growth factor β
TNFs	Tumor necrosis factors
uPA	Urokinase plasminogen activator
VDR	Récepteur de la vitamine D

***« Je dédie ce mémoire à mes parents
et à mes sœurs qui m'ont encouragée
tout au long de mes études. Je vous
l'offre en témoignage de mon amour
pour vous. »***

***« Con todo mi amor para ustedes a
quienes quiero tanto »***

REMERCIEMENTS

Pour commencer, j'aimerais remercier D^r Lajeunesse, mon directeur de recherche qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a aidée tout au long de mon projet d'étude. Merci pour votre grande disponibilité, votre encouragement et votre énorme collaboration au bon déroulement de ce projet. Je voudrais également remercier chaleureusement Aline Delalandre pour son aide technique, sa très belle personnalité, sa vitalité qui créait une très bonne ambiance dans le laboratoire. En plus, j'aimerais remercier le personnel de l'unité de recherche en arthrose qui était toujours disponible pour me collaborer dans mon projet.

Au-delà du travail, il y a la famille. Je voudrais remercier infiniment mon père Heriberto et ma mère Hortencia pour leur soutien moral durant toutes ces années d'études. Merci pour votre encouragement, merci pour votre amour inconditionnel et votre support financier. Grâce à vous je suis rendue où vous me voyez présentement, et il n'existe pas de mots pour décrire l'affection que je vous porte et je me compte chanceuse de vous avoir toujours eu à côté de moi. Je remercie aussi ma sœur Angie et ma petite sœur Priscilla puisque votre présence et vos encouragements m'ont aidée à poursuivre et à continuer tout ce que j'entreprenais.

Étant catholique je remercie Dieu qui a toujours veillé sur moi tout au long de ma vie. Je remercie aussi mon copain pour sa présence, son amour et son soutien indubitable lorsque j'entamais différents projets.

*" Dios conmigo yo con él,
él delante yo tras él"*

A: INTRODUCTION

L'existence des maladies rhumatismales est connue depuis plusieurs siècles. En effet, on aurait identifié des lésions arthritiques à l'examen des squelettes de reptiles préhistoriques de même qu'au niveau des articulations de momies égyptiennes. Le terme «rhumatisme» vient du grec *rheumatismos* dérivé de *rheuma* qui signifie fluxion. La terminologie rhumatologique moderne a conservé ces termes anciens tout en leur donnant une signification différente. Ainsi, dans le langage populaire, le terme «rhumatisme» désigne l'ensemble des maladies affectant le système musculo-squelettique; il est moins souvent utilisé comme abréviation des maladies rhumatismales. Les maladies rhumatismales sont celles qui impliquent l'une des composantes du système musculo-squelettique.

Les problèmes sociaux-économiques liés aux maladies rhumatismales sont d'une extrême importance, puisque ces affections sont parmi les principales causes de morbidité au Canada. Une enquête du ministère fédéral de la Santé et du Bien-être social faite conjointement avec Statistiques-Canada révèle que plus de 4 000 000 de Canadiens étaient atteints d'arthrite dans les années 90. Dans la population canadienne, les maladies rhumatismales sont plus fréquentes que chacune de ces maladies : les allergies, les affections respiratoires, les maladies du cœur ou l'hypertension artérielle. À cause de leur fréquence, elles viennent donc au tout premier rang parmi les maladies chroniques observées au pays.

Sur le plan social cette situation est très grave puisqu'on estime que 60% des arthritiques canadiens sont âgés de 15 à 64 ans, environ 30% ont entre 30 et 45 ans et que 74 000 enfants souffrent d'arthrite. On a également constaté que la plupart des arthritiques au Canada ont présenté les premières manifestations de leur maladie alors qu'ils avaient entre 30 et 45 ans, donc au cours des années les plus productives de leur vie. Les maladies rhumatismales présentent un problème nosologique important en raison de leur polymorphisme et surtout à cause de leur étiologie souvent incertaine. On peut séparer en gros les maladies des articulations en plusieurs sous-groupes : les arthroses, les grands rhumatismes inflammatoires, les maladies du collagène, les arthropathies métaboliques et les tendinites. Dans ce mémoire, nous allons nous consacrer uniquement sur l'arthrose car de toutes les arthropathies, elle est celle que l'on rencontre le plus souvent, et représente entre 60 à 65% des cas établis.

I L'ARTHROSE :

Il y a un siècle des études pathologiques et radiographiques ont permis la division de l'arthrite chronique en 2 formes importantes : l'atrophique et l'hypertrophique (Goldthwait, 1904). L'atrophique est reliée à l'ostéoporose et à l'arthrite rhumatoïde. L'hypertrophique de son côté caractérise l'arthrose. L'arthrose aussi appelée ostéoarthrite, arthrite hypertrophique, arthrite dégénérative, ostéo-arthrose ou maladie dégénérative de l'articulation est un des problèmes médicaux les plus fréquents et symptomatiques surtout pour les personnes âgées (Praemer, 1992; Felson, 1998). L'arthrose représente un

groupe de maladies distinctes qui se ressemblent mais avec différentes étiologies. Par contre, ils sont similaires biologiquement, morphologiquement et ont des conséquences cliniques semblables. La progression de cette maladie n'affecte pas seulement le cartilage articulaire mais implique l'articulation complète incluant l'os sous-chondral, les ligaments, la capsule, la membrane synoviale et les muscles périarticulaires. Ultérieurement, le cartilage articulaire se dégrade avec des fibrillations, des fissures, des ulcérations et une perte complète de l'épaisseur de la surface articulaire (Kuttner, 1995). Cette définition est la plus récente donnée pour l'arthrose; elle a été développée en 1994 lors d'un atelier intitulé « New Horizons in Osteoarthritis » où l'Académie américaine des chirurgiens orthopédiques, l'Institut national de l'arthrite, ainsi que d'autres organismes étaient présents. On peut aussi ajouter à cette définition de l'arthrose les changements hypertrophiques de l'os qui se produisent, ainsi que la formation des ostéophytes et l'épaisseur de l'os sous-chondral (Martel-Pelletier, 1999). La dégradation articulaire qui cause le syndrome clinique de l'arthrose se produit plus fréquemment dans les mains, les pieds, les genoux, la hanche et dans les jointures de l'épine dorsale. En plus, il peut se développer dans n'importe quelle articulation synoviale (Dieppe, 1995; Felson, 1995).

I.1. LA PATHOLOGIE :

Dans l'arthrose, le cartilage articulaire, l'os sous-chondral et la membrane synoviale sont les sites majeurs de changements au cours de la progression de la maladie. L'arthrose est caractérisée par la dégradation et la perte du cartilage

articulaire. En outre, il y a des changements dans le tissu osseux dont la formation d'ostéophytes, le remodelage anormal de l'os sous-chondral, et au niveau clinique de la maladie, une inflammation chronique de la membrane synoviale (Figure 1). Les premiers signes visibles du changement structural du cartilage articulaire dans l'arthrose est la fibrillation ou la perturbation de la zone superficielle qui s'étend aussi dans la zone transitionnelle et la violation de la «tidemark» par les vaisseaux sanguins de l'os sous-chondral (Buckwalter, Martin et al., 2000). En effet, il est cru que des charges excessives répétées provoquent des lésions dans l'os sous-chondral (incluant une perturbation des vaisseaux sanguins) ce qui empêche le passage de nutriments vers le cartilage articulaire (Imhof, Breitenseher et al., 1999). Certains chercheurs ont postulé comme théorie que l'épaississement de l'os sous-chondral précède et cause la dégradation du cartilage articulaire et que la progression et la dégradation du cartilage requière l'épaississement de l'os sous-chondral (Radin et Rose, 1986). D'autres chercheurs ont argumenté que la perte du cartilage articulaire amène à une augmentation de la charge de stress sur l'os sous-chondral, ce qui causerait le remodelage osseux. On ne sait pas encore laquelle de ces deux théories est correcte, ou si ces deux théories sont complémentaires. Dans plusieurs cas la dégénération du cartilage articulaire et les perturbations du remodelage de l'os sous-chondral sont présents quand les patients développent les symptômes, et c'est la perte du cartilage articulaire qui entraîne directement la perte de la fonction de l'articulation. D'autre part, il y a aussi des changements physiologiques qui sont importants. En effet, du blanc translucide et lisse qui est

Le genou arthrosique

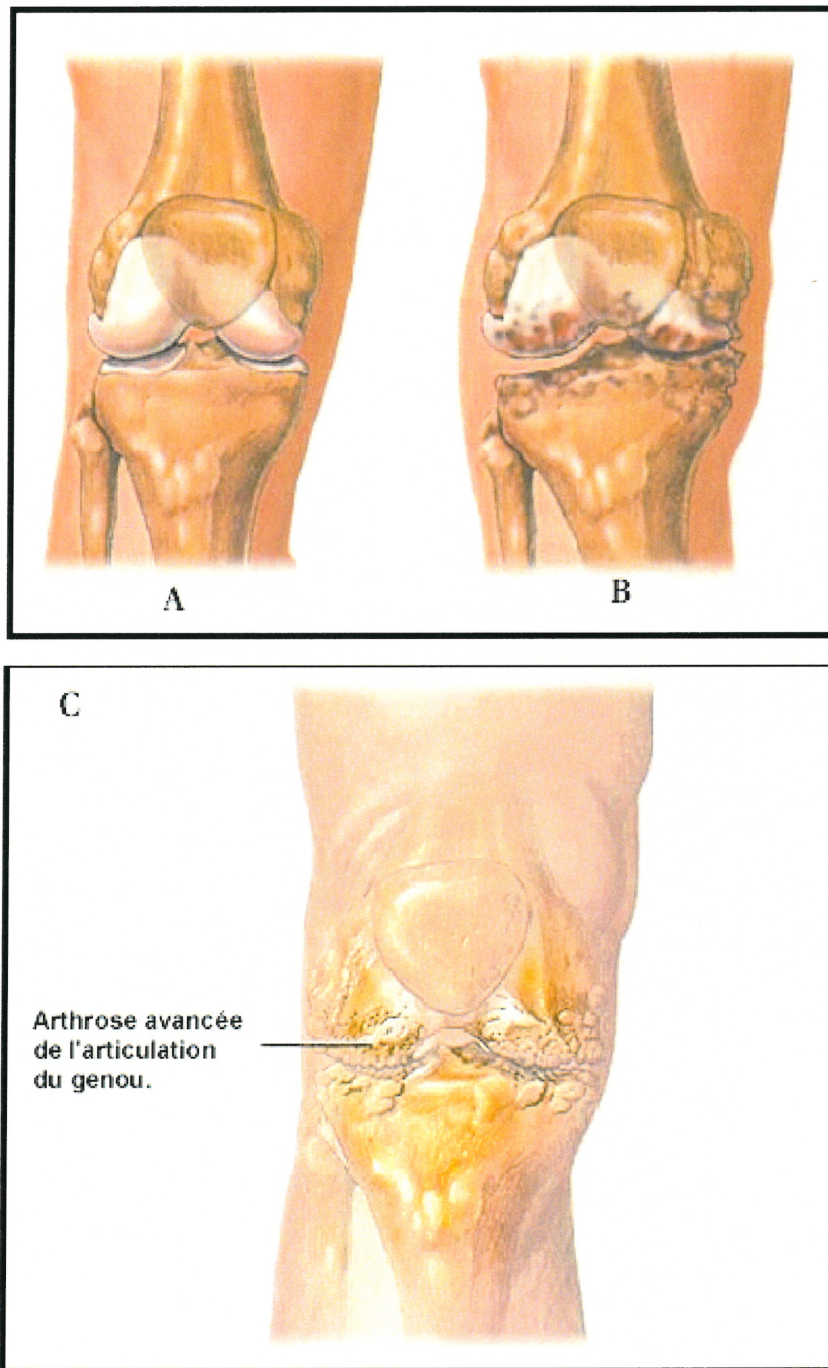


Figure 1: A) Genou normal. B) Hypertrophie, excroissance de l'os et érosion du cartilage. C) Arthrose du genou à un stade très avancée de la maladie.

l'état normal, le cartilage en voie de dégénérescence devient jaunâtre, opaque et rugueux. On y voit de petits îlots de ramollissement qui évoluent vers la fibrillation, la fissuration et éventuellement une disparition tissulaire progressive. L'os sous-chondral dénudé devient dense et kystique. Une prolifération osseuse détermine la formation d'éperons irréguliers recouverts d'un tissu cartilagineux (Vaillancourt, 1990). Ces ostéophytes périphériques apparaissent en zones de non-pression et aux points de fixation des ligaments et tendons. Sur le plan clinique, l'arthrose se manifeste initialement par de la raideur articulaire survenant particulièrement après une période d'immobilisation (gel articulaire). La douleur aux mouvements et à l'appui est d'intensité variable, et disparaît au repos. Bien qu'on ne puisse habituellement pas prévenir ou modifier le cours de la maladie, on a les moyens d'en contrôler les manifestations et de permettre aux malades qui en sont victimes, de poursuivre une existence à peu près normale.

1.2. L'ÉPIDÉMIOLOGIE :

Une étude statistique du gouvernement américain confirme que la maladie devient plus fréquente avec l'âge. Ainsi, 4% de la population âgée de 18 à 24 ans présentent des manifestations radiologiques d'arthrose alors qu'après 75 ans, la fréquence est de 85% (Vaillancourt, 1990). En général, approximativement un tiers des adultes âgés entre 25 et 74 ans ont des radiographies avec au moins un site qui démontre de l'arthrose (Lawrence, Hochberg et al., 1989). La fréquence de l'arthrose ainsi que la proportion des cas moyens ou des maladies sévères hausse avec l'accroissement de l'âge surtout de 65 à 74 ans. L'arthrose est plus

fréquente chez l'homme que chez la femme pour ceux qui ont 45 ans et moins. Par contre, elle est plus courante chez les femmes que chez les hommes de 54 ans et plus. Entre autres, il a aussi été démontré que les radiographies du genou arthrosique sont plus communes chez les femmes noires que chez les femmes blanches (Anderson et Felson, 1988).

I.3. LES FACTEURS DE RISQUES POUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'OA :

Plusieurs études ont été effectuées sur les facteurs à risques pour le développement de l'arthrose. Ces facteurs incluent les facteurs génétiques et non-génétiques ainsi que les facteurs environnementaux. Dans cette section on va faire le focus sur trois facteurs associés avec l'arthrose du genou : l'obésité, l'occupation/activité physique et la génétique.

I.3.1. L'OBESITÉ :

Avant de commencer à traiter de façon plus approfondie ce facteur de risque de l'arthrose, il faudrait expliquer la répartition des charges dans le genou. Les chercheurs qui se sont intéressés à la biomécanique du genou ont calculé que normalement le genou supporte 43% du poids du corps et qu'à la marche la charge supportée par chaque genou est égale à 5 ou 6 fois le poids du corps. De plus, dans le cas de mauvaise position de l'articulation, ces charges seront encore majorées; c'est dire l'importance de la correction de l'attitude et l'intérêt que l'on a à essayer de faire maigrir les patients obèses qui souffrent des genoux (Saal, 1993). En effet, des recherches ont démontré clairement que le surpoids est le

facteur de risque le plus important pour le développement de l'arthrose du genou pour les deux sexes. Par contre, son rôle dans le développement de l'arthrose de la hanche reste controversé. Plusieurs études épidémiologiques ont trouvé une association entre l'obésité et les radiographies des genoux arthrosiques (Hartz, Fischer et al., 1986; Davis, 1989; Hochberg, 1995; Davis, 1998). Il semble évident qu'un poids excessif impose une charge mécanique sur les articulations qui subissent une érosion, mais il y a d'autres études qui indiquent que la situation n'est pas aussi simple. Ainsi, chez la souris, l'obésité n'a aucun effet sur l'arthrose (Hough, 1996). Des études longitudinales ont prouvé que l'obésité précède l'incidence de l'arthrose du genou mais que ce n'est pas une conséquence de l'apparition de la maladie (Felson, Anderson et al., 1988). La perte de poids prévient le développement des symptômes de l'arthrose du genou chez les femmes, spécialement chez celles qui ont un historique de surpoids. Il existe 2 théories entre l'obésité et l'arthrose. La théorie la plus attirante, est que l'obésité augmente la force à travers l'articulation et celle-ci causerait la dégénération du cartilage, ce qu'on appelle la théorie mécanique. La deuxième théorie impliquerait un facteur métabolique, comme une hormone ou un médiateur biologique qui serait relié à l'obésité et causerait l'arthrose. Davis et ses associés (Davis, Ettinger et al., 1988), utilisant les données du NHANESI (National Health and Nutrition Examination Survey I), ont examiné si les facteurs associés à l'obésité incluant le cholestérol dans le sérum, l'acide uridique du sérum, le diabète, la distribution du gras dans le corps, et la pression sanguine pouvaient par eux-mêmes causer l'arthrose. Ils ont trouvé que l'obésité en soi était le facteur

le plus associé à l'arthrose et que les autres facteurs n'influencent pas l'association entre l'obésité et l'arthrose du genou.

I.3.2 L'ACTIVITÉ PHYSIQUE ET OCCUPATION :

Des facteurs mécaniques ont été proposés pour initier l'arthrose dans des articulations spécifiques. Certaines occupations qui requièrent une utilisation répétitive de certaines articulations particulières pour une période prolongée ont été associés au développement de l'arthrose. En effet, les mineurs ont un taux d'arthrose du genou et de l'épine dorsale très élevé (Kellgren, 1952), d'autre part les ouvriers des chantiers navals et les débardeurs ont une fréquence plus élevée d'arthrose du genou et des doigts de la main, que ceux qui travaillent dans un bureau. Selon une étude suisse, les fermiers, les pompiers, les ouvriers en textile, les bûcherons et avec un degré moindre, les pêcheurs ont un niveau très élevé d'arthrose de la hanche (Anderson et Felson, 1988). La relation entre l'arthrose et l'occupation d'une personne a été le sujet de plusieurs revues (Felson, 1994; Cooper, 1995). En termes de prévention, la relation entre la profession et l'arthrose peut être extrêmement importante. Les tâches reliées à certaines occupations, qui sont spécifiquement associées avec l'augmentation du risque de développer l'arthrose, pourraient être changées ou éliminées. Malheureusement, la relation entre l'arthrose et le travail de la personne n'est pas une cible facile pour la prévention de cette maladie. D'autre part, puisque l'arthrose prend des années à se développer, d'autres facteurs de risques doivent être pris en considération et être étudiés. Dans les facteurs mécaniques on peut aussi inclure

les sports et les exercices. Plusieurs études ont examiné la relation entre l'activité physique régulière et l'arthrose : la plupart des récentes études européennes ont inclus les athlètes d'élite, particulièrement les joueurs de football, les coureurs ainsi que les joueurs de soccer. Panush et Lane (Panush et Lane, 1994) et Lane & Buckwalter (Lane et Buckwalter, 1993) ont révisé ces études ainsi que d'autres études plus anciennes, et ont conclu que l'individu qui participe à un sport de compétition d'élite a un risque élevé de développer de l'arthrose comparativement aux personnes normales qui ont participé à des activités de moindre impact. La course, comme activité récréative, ne paraît pas un facteur à risque pour le développement de l'arthrose du genou surtout en l'absence des blessures du genou (Lane, Bloch et al., 1986; Lane, Bloch et al., 1990; Lane, Michel et al., 1993).

I.3.3. LA GÉNÉTIQUE :

Des facteurs génétiques contribuant à l'arthrose chez l'humain ainsi qu'à d'autres espèces, pourraient avoir des effets systématiques et/ou métaboliques (Hirsch, Lethbridge-Cejku et al., 1996; Hirsch, Lethbridge-Cejku et al., 1998). Les données en ce qui concerne les nodules de Heberden (articulations interphalangiennes distales des doigts) ont été interprétées comme l'implication d'un seul gène qui est dominant chez les femmes et récessif chez les hommes (Kellgren, 1963). D'autre part, une augmentation de la fréquence d'un certain antigène HLA chez les patients qui ont une arthrose généralisée suggère l'implication d'un composé génétique (Patrick, 1989). De la même façon, il y a

aussi une association avec un polymorphisme du gène d'estrogène (Ushiyama, Ueyama et al., 1998) et des anomalies du chromosome 2q (Wright, Hughes et al., 1996). De même, le polymorphisme du gène du récepteur de la vitamine D (Keen, Hart et al., 1997) a été associé avec le début de l'arthrose du genou. D'autre part, une étude sur des jumeaux a démontré une incidence plus élevée d'arthrose chez les jumeaux identiques que chez des jumeaux non-identiques. Ceci a permis de conclure que l'influence génétique impliquant les mains et les genoux peut atteindre jusqu'à 65% (Spector, Cicuttini et al., 1996). En outre, certains progrès ont été fait pour identifier les défauts héréditaires, comme dans le collagène de type II qui pourrait être responsable du développement primaire de l'arthrose chez les membres affectés dans certaines familles (Garnero, Gineyts et al., 2002). Davantage de recherches seront nécessaires cependant pour comprendre le rôle des facteurs génétiques dans l'arthrose (Radin et Rose, 1986).

II LE TISSU CARTILAGINEUX :

Au cours d'une vie d'adulte le cartilage articulaire subit un niveau élevé de stress biomécanique. Chez plusieurs individus et dans la plupart des sites anatomiques, le cartilage peut tolérer des années de pression répétitives. Par contre, lors de traumatismes et/ou avec l'âge, des dommages dans le cartilage se produisent souvent à des sites particuliers, par exemple dans la hanche et le genou. Dans cette section nous allons décrire le cartilage normal et arthrosique.

II.1. LE CARTILAGE NORMAL:

Le cartilage articulaire normal est un cartilage hyalin, donc, riche en substance fondamentale. Macroscopiquement, le cartilage articulaire du sujet jeune est blanc, légèrement bleuâtre, sa surface est lisse, régulière, humide et très glissante. Le tissu est ferme et se laisse difficilement comprimer. Le cartilage est composé de chondrocytes et d'une matrice extracellulaire. Les cellules sont relativement peu nombreuses et contribuent approximativement à 1% du volume du tissu. L'eau et les macromolécules comme les collagènes, les protéoglycanes, les protéines non-collagéniques et les glycoprotéines forment la matrice extracellulaire (Buckwalter, 1997). Le collagène majeur présent dans le cartilage est celui de type II, lequel compte pour 90-95% du collagène total dans le cartilage hyalin (Burgeson et Nimni, 1992). Les autres formes de collagène dans le cartilage sont le type IX, XI, VI, X, XII, XIV et varient en fonction de l'état de différenciation des chondrocytes, de leur site dans le cartilage et selon l'âge de l'individu (Poole, 2001). L'eau est le constituant majeur du cartilage, et représente 60-80% du poids humide du cartilage. L'eau y existe sous forme libre et liée aux protéoglycanes. L'eau liée confère au tissu sa turgescence et l'eau libre véhicule les substances nutritives et les déchets métaboliques. Dans le cartilage hyalin, les chondrocytes sont responsables de la synthèse, du remodelage et du turnover de la matrice extracellulaire (Gray, Pizzanelli et al., 1988). Les chondrocytes sont les éléments vivants du cartilage. Ils élaborent et dégradent, en permanence, les constituants de la substance fondamentale et assurent l'intégrité structurale du cartilage (Mitrovic, 2000). Leur nombre et leur aspect varient en fonction de leur

position dans le tissu. Le cartilage articulaire a structurellement quatre zones clairement distinguables de la surface jusqu'à l'os sous-chondral (Redler, 1974). Premièrement, il y a la zone superficielle tangentielle qui est la plus haute (élevé), ensuite il y a la zone du milieu suivi de la zone plus profonde et enfin la zone calcifiée qui est juste en haut de l'os sous-chondral, cette zone contenant une mince couche de cartilage calcifié (Poole, Pidoux et al., 1982; Poole, Flint et al., 1987; Buckwalter, 1997).

II.2. LE CARTILAGE ARTHROSIQUE :

Les altérations du cartilage arthrosique sont nombreuses et impliquent des changements morphologiques et synthétiques des chondrocytes ainsi que des altérations biochimiques et structurales des matrices extracellulaires des macromolécules (Martel-Pelletier, 1999). Ainsi, l'expression et l'activité des protéinases dans le cartilage augmente et les inhibiteurs des protéinases diminuent en contenu (Poole, 1995), résultant en une nette activité des protéinases. L'évidence de ceci vient d'une examination du changement de la structure, du contenu, de la distribution, et de la dégradation des molécules de la matrice. Les connaissances actuelles indiquent une importante implication des métalloprotéases (MMP). En effet, il y a une augmentation de la dégradation des aggrecanes par les MMPs et les aggrecanases (Woolley, Crossley et al., 1977). Au début du développement de la maladie, on peut voir des dommages dans le collagène ainsi qu'une augmentation de la dégradation des aggrecanes (Rizkalla, Reiner et al., 1992; Guilak, Ratcliffe et al., 1994). Des pertes locales de

protéoglycane aggrécane, de décorine, et du biglycan de la surface articulaire, de même qu'autour des chondrocytes sont observées au début de l'arthrose humaine ou de l'arthrose induite expérimentalement (Hollander, Pidoux et al., 1995). L'aggrécane est probablement le premier constituant du cartilage à être affecté parce qu'il y a une diminution progressive en parallèle avec la sévérité de la maladie. À une certaine étape de l'évolution de l'arthrose, les chondrocytes apparaissent incapables de compenser totalement pour la perte des protéoglycanes en augmentant leurs synthèses, résultant en une perte nette de la matrice (Pelletier, 2001). Lorsque la maladie est avancée, les molécules d'aggrécane sont plus larges et les glycosaminoglycans sont chimiquement et immunochimiquement différents (Rizkalla, Reiner et al., 1992). Cette structure est indicative de la perte de molécules préexistantes et de leurs remplacements avec de nouveaux protéoglycanes synthétisés. Lors d'une arthrose avancée, quand le dommage du collagène est étendu avec comme résultat une profonde fibrillation, il y a une perte nette d'aggrécane et de hyaluronan (Sweet, Thonar et al., 1977; Thonar, Sweet et al., 1978; Thompson et Oegema, 1979). Les dommages causés au collagène de type II sont initialement autour des chondrocytes qui sont à la surface articulaire et cela implique progressivement les cellules qui sont dans les couches plus profondes à mesure que la maladie progresse (Dodge et Poole, 1989; Hollander, Pidoux et al., 1995). Les propriétés élastiques du collagène du cartilage sont donc perdues (Kempson, Muir et al., 1973; Akizuki, Mow et al., 1986). D'autre part, les changements dégénératifs du cartilage arthrosique sont accompagnés par des changements marqués dans les facteurs de croissance et

l'expression de cytokines/récepteurs (Melchiorri, Meliconi et al., 1998) impliquant ces molécules dans la pathogénèse de cette maladie.

En résumé, on peut dire que le cartilage normal est un composant complexe, contenant une matrice solide composée premièrement de collagène et de protéoglycane qui est saturée d'eau. Les chondrocytes sont responsables de la production et de la maintenance de ces matériels. Par contre, dans le cartilage arthrosique, il est clair que la perte du cartilage articulaire est le résultat d'une perturbation de l'intégrité structurale du cartilage articulaire lié à ou causé par un déséquilibre dans l'activité anabolique et catabolique du tissu. Ce déséquilibre affecte la majorité des facteurs impliqués dans la formation du cartilage, surtout les aggrecanes qui sont dépendantes de la progression de la maladie, ce qui produit la perte de la matrice.

III LE TISSU OSSEUX:

L'os agit comme un support pour le corps, comme un réservoir de calcium et de phosphate et comme site de l'hématopoïèse. Les cellules existantes dans l'os sont les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. La structure de l'os est maintenue par une relation entre les cellules ostéoblastes/ostéocytes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes ont pour fonction de former et les ostéoclastes de résorber l'os respectivement. Les cellules osseuses forment seulement une petite

Coupe partielle du fémur

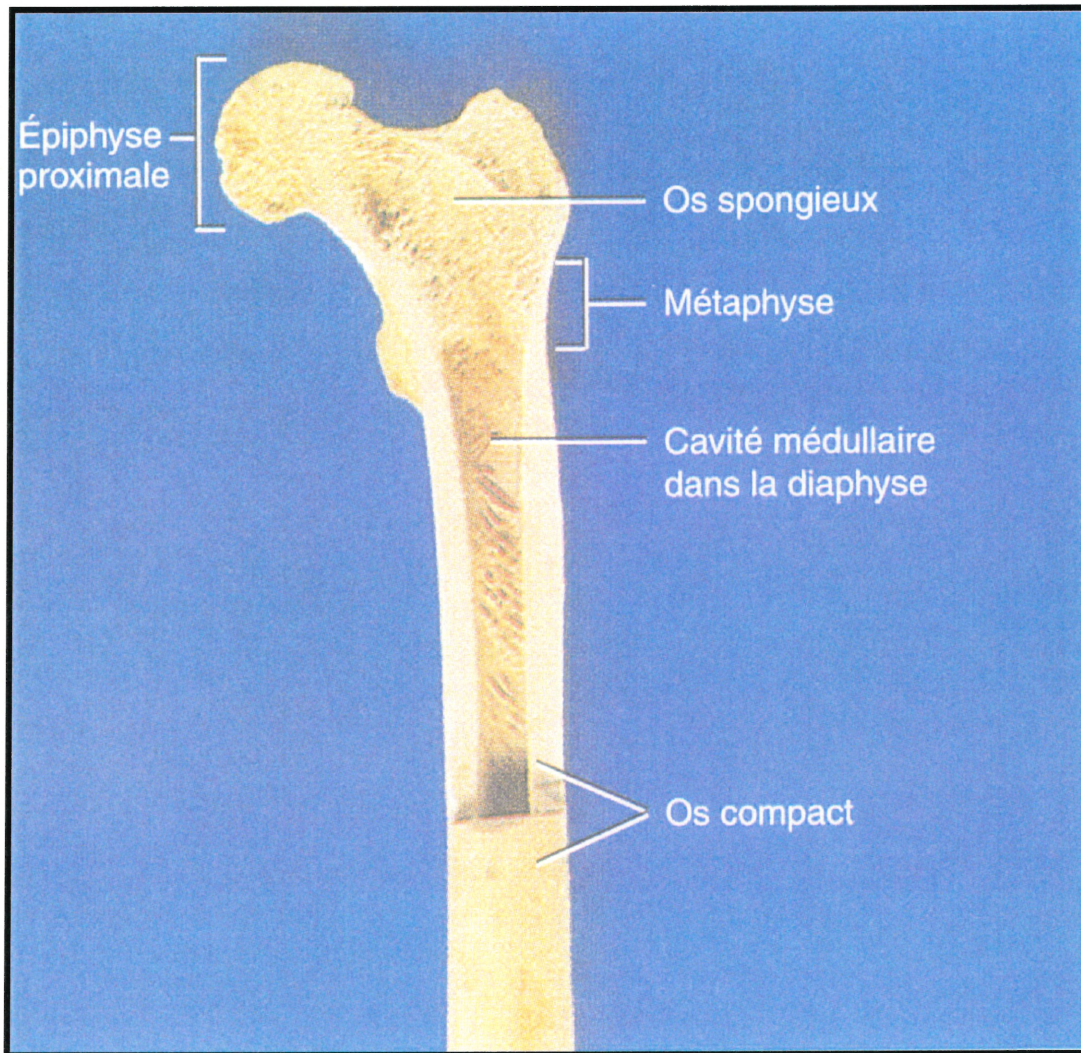


Figure 2: Les parties d'un os long. L'os spongieux de l'épiphyse et de la métaphyse contient la moelle osseuse rouge, tandis que la cavité médullaire de la diaphyse contient la moelle osseuse jaune.

portion (2%) de la totalité des composés organiques de l'os, la plupart étant constitué de la matrice ostéoïde produite par les ostéoblastes. Le collagène (majoritairement le type I) est le composé organique majeur de l'os, qui constitue jusqu'à 95% de la matrice ostéoïde. Les composés organiques de l'os (les cellules plus la matrice organique) représentent approximativement 30% du poids sec de l'os, les composés inorganiques ainsi que les minéraux représentent 70% du poids total. La partie externe de l'os est formée par une couche de tissu calcifié qui est épaisse et dense appelé : cortex ou os compact. La partie interne de l'os est remplie d'un mince réseau de trabécules ou travées osseuses calcifiées, appelé os trabéculaire. L'os trabéculaire ou spongieux est baigné par la moelle osseuse dans les os longs qui lui sert de protection (Figure 2).

III.1. L'OS CORTICAL OU COMPACT :

Le squelette est constitué de 90% d'os cortical ou compact qui forme la diaphyse des os longs, par exemple les os des membres, et qui entoure les os plats, comme les vertèbres. Cet os est dit compact, c'est à dire que 95% du volume de ce tissu est occupé par la matrice osseuse (Vernejoul, 1993). Il a un contenu en minéraux très élevé, approximativement 70%, et sa fonction est principalement mécanique. L'os compact se divise en unités appelées ostéons ou système de Havers (Figure 3). Les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et les nerfs du périoste pénètrent dans l'os compact par les canaux perforants, ou canaux de Volkmann. Les vaisseaux et les nerfs de canaux perforants rejoignent ceux de la cavité médullaire, du périoste et du canal central de l'ostéon. Le canal

Systeme de havers dans un os compact

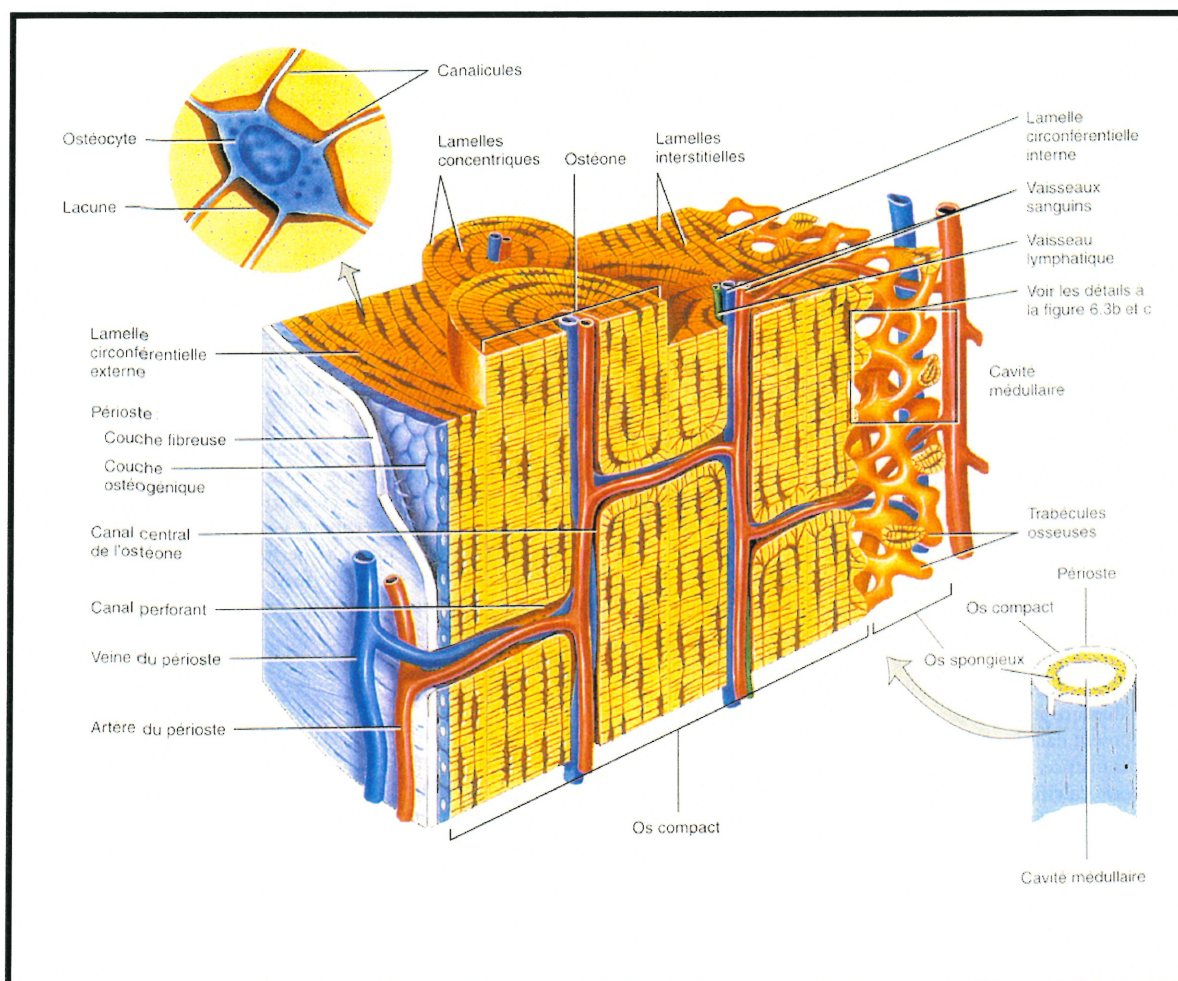


Figure 3 : Coupes de la diaphyse d'un os long montrant le périoste à gauche, l'os compact au centre, l'os spongieux et la cavité médullaire à droite. En médaillon (en haut à gauche) un ostéocyte dans une lacune.

central de l'ostéon traverse l'os longitudinalement. Les canaux sont entourés de lamelles concentriques composées de matrice solide calcifiée. Entre les lamelles se trouvent des petits espaces, appelées lacunes, qui contiennent les ostéocytes. De ces lacunes, de minuscules canalicules remplis de liquide extracellulaire partent dans toutes les directions. Les canalicules contiennent de minces excroissances issues des ostéocytes. Les canalicules relient les lacunes entre elles et avec le canal central de l'ostéon. Les multiples ramifications de ce réseau offrent de nombreuses voies de passage aux nutriments et à l'oxygène qui sont transportés par le sang et diffusent dans l'espace liquidien pour atteindre les ostéocytes, ainsi qu'aux déchets qui diffusent en sens contraire.

III.2. L'OS TRABÉCULAIRE :

À l'inverse l'os trabéculaire, aussi appelé spongieux, est limité aux métaphyses des os longs et à la partie centrale des os plats. L'os spongieux constitue la plus grande partie du tissu osseux des os courts, plats et irréguliers, et la plus grande partie des épiphyses des os longs; il forme un mince anneau autour de la cavité médullaire de la diaphyse des os longs. Il ne constitue que 10% du squelette et la matrice osseuse ne représente que 20% de ce tissu, le reste étant constitué par le tissu hématopoïétique(Vernejoul, 1993). Contrastant avec la structure régulière de l'os compact, l'os trabéculaire ressemble à un lacis, un réseau de travées osseuses délimitant des cavités remplies de moelle, un arrangement capable de résister aux contraintes auxquelles l'os est soumis. L'os trabéculaire possède aussi des canaux de Havers. L'os trabéculaire remplit les

sections croisés de l'os, occupant approximativement 20% de son volume. L'activité métabolique de l'os trabéculaire est approximativement 8 fois celle de l'os cortical, ce qui aiderait à expliquer pourquoi les maladies de l'os sont plus présentes dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical (Netter, 1987). En effet, les unités fonctionnelles de l'os trabéculaire subissent plus fréquemment le processus du remodelage que celles de l'os cortical en raison d'une plus grande surface de contact entre le tissu hématopoïétique et les cellules osseuses dans ce type d'os (Vernejoul, 1993). La composition biochimique et les propriétés physiques microscopiques sont très similaires entre l'os trabéculaire et l'os cortical.

IV LE REMODELAGE OSSEUX :

Le remodelage osseux est le processus physiologique qui permet le renouvellement de la matrice osseuse. Il implique la résorption de l'os suivi de la synthèse d'une nouvelle matrice osseuse et d'une minéralisation subséquente (formation de l'os). De plus, le remodelage osseux fait partie intégrante du système de l'homéostasie du calcium avec le rein et le foie. En effet, la résorption de l'os permet la libération du calcium et des constituants de la matrice et ceux-ci diffusent dans le sérum (Mundy, 1996). Le processus de remodelage est réglé au niveau local, puisqu'il survient successivement au sein de chacune des unités fonctionnelles. Le remodelage fait intervenir deux types principaux de cellules osseuses; les ostéoclastes et les ostéoblaste (Figure 4). Le bon déroulement de ce processus nécessite des interactions entre les cellules osseuses

Les cellules osseuses

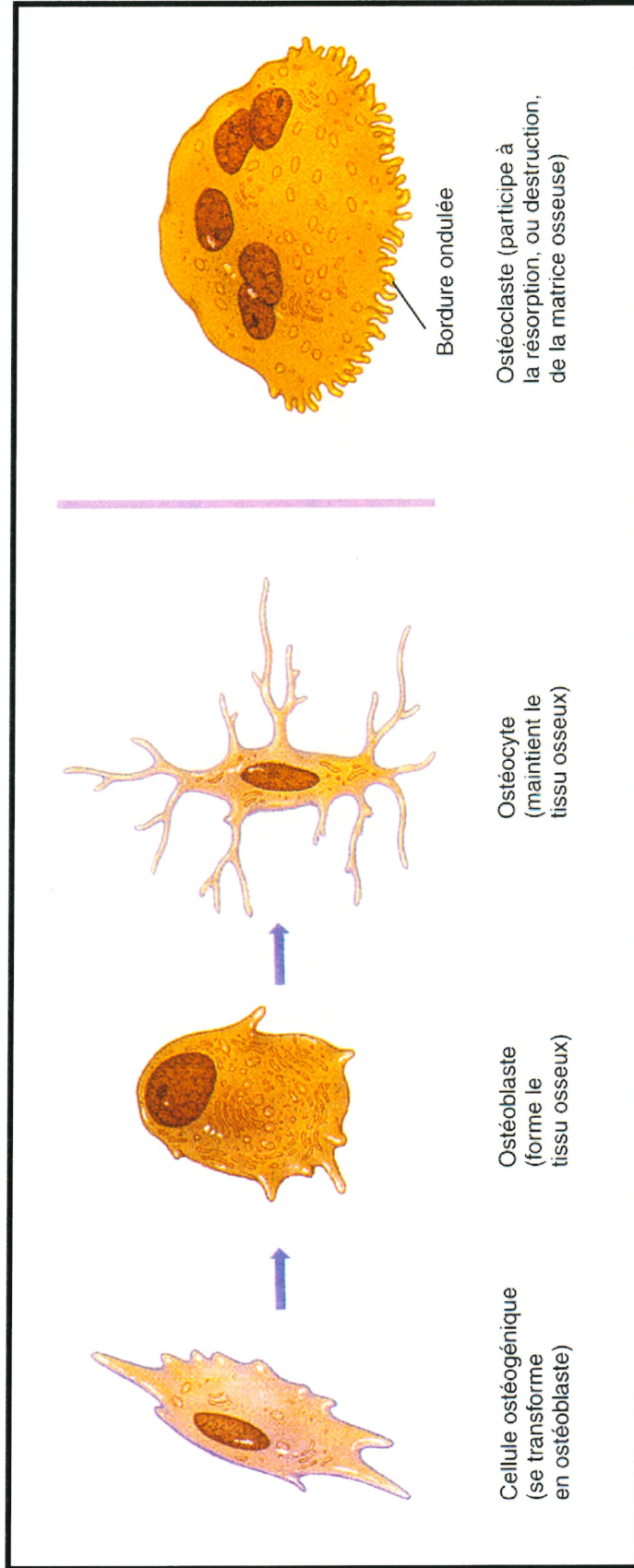


Figure 4: Les types de cellules existants dans le tissu osseux.

et la moelle hématopoïétique d'où émergent leurs précurseurs, et entre les cellules osseuses et la matrice osseuse synthétisée par les ostéoblastes. Le remodelage permet une restitution *ad integrum* et un maintien de la structure osseuse. Le remodelage osseux est régulé par des hormones systémiques et par des facteurs locaux qui affectent les ostéoclastes ou ostéoblastes, mais ceci nous le verrons plus en détails dans la section IV.3.

IV.1. L'OSTÉOBLASTE :

Le lignage des ostéoblastes occupe une position centrale dans le métabolisme de l'os. Les cellules ostéoblastes sont dérivées des précurseurs des cellules mésenchymales de la moelle osseuse qui a un potentiel de différenciation en cellules adipeuses, chondrocytes, ostéoblastes ou cellules musculaires (Bab, Ashton et al., 1986; Beresford, 1989). Ces précurseurs prolifèrent et se différencient en préostéoblastes et ensuite en ostéoblastes en suivant un patron de différenciation lié à des signaux hormonaux et/ou des facteurs de croissance systémiques ou locaux (Canalis, 1996). Les ostéoblastes sont responsables de la formation et de l'organisation de la matrice extracellulaire de l'os et de sa minéralisation subséquente. Les ostéoblastes n'apparaissent ni ne fonctionnent jamais seuls; les cellules sont regroupées en unités de 100 à 400 cellules par site de formation. Au niveau microscopique, l'ostéoblaste est une cellule cuboïdale emprisonnée dans une matrice osseuse, caractérisée par un noyau rond à la base de la cellule (opposé à la surface de l'os) d'un diamètre de 20 μm , par un fort cytoplasme basophile, et par un abondant complexe de

Golgi situé entre le noyau et l'apex de la cellule. Les ostéoblastes se trouvent toujours sur la paroi de la couche de la matrice osseuse qu'ils produisent avant sa calcification (appelé à ce point-ci matrice ostéoïde). Les ostéoblastes sont caractérisés par a) la présence d'un réticulum endoplasmique rugueux extrêmement bien développé avec des citernes dilatés et un contenu dense de granules b) la présence d'un grand complexe de Golgi comprenant de multiples replis (Baron, 1996). Les ostéoblastes synthétisent principalement: du collagène de type I (90% des protéines de l'os), des protéines dépendantes spécifiquement de la vitamine K dont l'ostéocalcine, des glycoprotéines phosphorylées incluant les sialoprotéines I et II, de l'ostéopontine et de l'ostéonectine, des protéoglycanes et de la phosphatase alcaline (Price, Oyajobi et al., 1994). Les ostéoblastes expriment aussi des récepteurs pour la PTH (Parathyroid hormone) et des stéroïdes comme pour l'estrogène et la vitamine D₃ ainsi que plusieurs molécules d'adhésion (intégrines) et des récepteurs pour les cytokines (Baron, 1996). À la fin de leur phase anabolique (active) caractérisée par une diminution et la perte de leur capacité de sécrétion, les ostéoblastes deviennent des cellules planes de la paroi ou des ostéocytes. Les ostéocytes sont des cellules osseuses plus matures imbriquées dans une matrice totalement minéralisée; ce sont les cellules les plus abondantes dans le tissu osseux. Ils sont originellement des cellules de formation osseuse (ostéoblastes) qui ont été piégées par la matrice osseuse qu'ils produisaient et qui par la suite est devenue calcifiée. Cependant, les ostéocytes ne sécrètent plus de matrice. Ils maintiennent plutôt les activités cellulaires quotidiennes du tissu osseux, comme ses échanges de nutriments et de déchets

avec le sang (Tortora, 2001). Les ostéocytes seraient aussi les cellules qui répondraient au stress mécanique du squelette et produiraient des signaux adéquats pour le maintien de l'intégrité de l'os (Netter, 1987).

IV.1.1 LE COLLAGÈNE :

Le collagène, principalement le type 1, est, avec les protéoglyphes (agrégats de protéines et d'hydrates de carbone), le constituant principal de la matrice extracellulaire osseuse. Par contre, le collagène de type 1 peut être aussi trouvé dans d'autres tissus comme la peau, la cornée, les vaisseaux sanguins, le fibrocartilage et les tendons. Il est fabriqué dans les cellules sous la forme de procollagène qui comporte une partie centrale faite de 3 chaînes unies en une triple hélice et deux peptides d'extension aux extrémités N et C terminales (Belaisch, 1998). Dans l'os le collagène est synthétisé par les cellules ostéoblastes sous la forme de pré-procollagène. Ces précurseurs sont caractérisés par un peptide initiateur de séquence et par un peptide terminal d'extension : le propeptide amino-terminal (PINP) et le propeptide carboxy-terminal (PICP) (Merry, Harwood et al., 1976). Lors de la formation osseuse les deux propeptides d'extension sont relargués dans l'espace extracellulaire, donc la molécule de procollagène subit un clivage enzymatique en trois parties inégales, le PINP et PICP passent dans la circulation tandis que la molécule de collagène 1 se dépose dans la matrice osseuse (Fessler, Morris et al., 1975). Les taux circulants de ces propeptides d'extension seront donc des témoins de la formation osseuse. En effet, le PICP a un poids moléculaire de 115 kDa, stabilisé par des

ponts disulfures, il circule comme une molécule seule et il est éliminé par les cellules endothéliales du foie via le récepteur de mannose (Olsen, Guzman et al., 1977; Smedsrod, Melkko et al., 1990). Le PINP a un poids moléculaire de 70 kDa, il est riche en proline et hydroxyproline, et est éliminé dans la circulation par les cellules endothéliales via le récepteur *scavenger* (Kivirikko, 1984). Ces deux propeptides sont mesurés par des tests immunologiques et permettent de déterminer le taux de formation du collagène. D'autre part, la molécule de collagène 1 possède aux deux extrémités de sa chaîne hélicoïdale deux petites zones linéaires appelées télopeptides en partie carboxy (C) ou amino (N) terminale de la molécule. Au niveau de ces télopeptides, des ponts disulfures unissent chaque molécule de collagène aux molécules voisines. Ces ponts sont appelés liens croisés « cross links ». Ainsi se forment des fibres de collagène. Ces liens croisés résultent de la condensation de molécules de lysine et d'hydroxylysine présentes sur deux chaînes voisines. Cette condensation aboutit à la formation de pyridinoline et de désoxypyridinoline qui possèdent une structure cyclique et ont la propriété d'émettre une fluorescence particulière. Ces structures libres n'apparaissent qu'au cours de la dégradation des fibres de collagène. Leur présence est donc le témoin de la résorption osseuse (Belaisch, 1998).

IV.1.2. LA PHOSPHATASE ALCALINE :

Différentes enzymes qui régulent la phosphorylation des phosphoprotéines et la déphosphorylation ont été associées avec le processus de minéralisation de l'os. De ce fait, les phosphoprotéines kinases, qui régulent la phosphorylation des

phosphoprotéines, et la phosphatase alcaline ainsi que d'autres phosphatases sont très importantes dans ce processus (Eyre, 1996). La phosphatase alcaline est une enzyme tétramérique liée à la membrane et attachée aux parties glycosyl-phosphatidyl-inositol situées sur la partie externe de la surface de la cellule (Stinson et Hamilton, 1994). La phosphatase alcaline est un produit proéminent des ostéoblastes et des précurseurs des ostéoblastes. La fonction principale de cette enzyme est inconnue, mais elle joue un rôle très important dans la minéralisation de la matrice ostéoïde. En effet, la phosphatase alcaline hydrolyserait les esters de phosphate ce qui augmenterait la concentration locale en phosphate libre, permettant une augmentation du taux et de l'étendue de la minéralisation. Des études sur des cultures d'ostéoblastes *in vitro* ont démontré que les cellules en manque de phosphatase alcaline ne minéralisent pas, à moins qu'elles soient transfectées par cette enzyme (Eyre, 1996). Le rôle exact de la phosphatase alcaline à promouvoir la calcification est autant matière à débat de nos jours, que lorsque Robinson dans les années 1920 a suggéré qu'il était associé à la minéralisation (Robinson, 1923). La totalité de la phosphatase alcaline dans le sérum consiste à plusieurs « isoformes » qui sont originaires des tissus différents comme le foie, la rate, l'os, l'intestin, le rein, et le placenta (Seibel, 2000). En plus, certaines tumeurs peuvent aussi exprimer des formes macromoléculaires de la phosphatase alcaline (Koyama, 1985; Jenkins, Steer et al., 1999). La majorité de la phosphatase alcaline dans le sérum indique cependant la formation de l'os et l'activité des ostéoblastes (Hyldstrup, Clemmensen et al., 1988; Van Straalen, 1991).

IV.1.3. L'OSTÉOCALCINE :

L'ostéocalcine, ou également Bone GLA-protein (BGP), est la protéine non-collagèneuse majeure présente dans l'os. Elle est reconnue comme un marqueur de la formation de l'os. L'une des caractéristiques de l'ostéocalcine est qu'elle est dépendante des vitamines K et D (Price et Baukol, 1980). Elle est produite par les ostéoblastes, et peut être aussi exprimée dans les odontoblastes et les chondrocytes hypertrophiques. Elle est exprimée tôt lors du processus de minéralisation et s'accumule dans la matrice osseuse extracellulaire (Hauschka, Lian et al., 1989). L'ostéocalcine a 49 résidus d'acides aminés (5.8kDa) et est assez bien conservée entre les espèces. Cette protéine est sécrétée par les ostéoblastes et a une très haute affinité pour l'hydroxyapatite, une propriété liée à la présence de trois sites de carboxylation dans la molécule. Cette propriété jouerait un rôle critique pour l'ostéocalcine dans la régulation de la formation de la phase minérale de l'os (Lian, Stein et al., 1998). Des recherches antérieures ont démontré que l'ostéocalcine est impliquée dans le processus de la minéralisation de la matrice ostéoïde, puisque la protéine est exprimée primordialement dans cette phase de la formation de l'os. Par contre, même si l'ostéocalcine est connue depuis plus de 20 ans, sa fonction principale réelle n'a pas encore été déterminée. Récemment, une étude menée par Ducy et al a démontré que chez la souris knock-out d'ostéocalcine on observait une augmentation de l'épaississement de l'os cortical et trabéculaire, donc une augmentation de la formation osseuse (Ducy, Desbois et al., 1996). Ceci suggère que l'ostéocalcine pourrait avoir un rôle dans la régulation de la fonction des cellules ostéoblastes. La majorité de

l'ostéocalcine sécrétée par les ostéoblastes est déposée dans la matrice osseuse extracellulaire; l'ostéocalcine présente dans le sérum représente la fraction de l'ostéocalcine qui n'a pas été absorbé par l'hydroxyapatite. En effet l'ostéocalcine présente dans le sérum représente de 10 à 40% l'ostéocalcine qui n'a pas été incorporé dans la matrice osseuse (Lee, Hodges et al., 2000).

IV.2. L'OSTÉOCLASTE :

L'ostéoclaste est une volumineuse cellule multinucléée contenant de 3-5 à 12-15 noyaux dépendant des espèces, et il peut atteindre un diamètre de 100 μm . Les ostéoclastes sont des cellules d'origine hématopoïétique jouant un rôle important dans le remaniement et la résorption osseuse. Ils ont des caractéristiques phénotypiques des cellules de la lignée des monocytes/macrophages (Hayashi, Yamane et al., 1998). Des études ultrastructurales ont démontré que les ostéoclastes résorbant (le contraire des ostéoclastes non-résorbant) sont des cellules fortement polarisées. Des données récentes suggèrent que les ostéoclastes qui résorbent l'os contiennent non seulement une zone d'ancrage à la matrice osseuse mais aussi 3 autres domaines membranaires spécialisés : une bordure en brosse, un domaine de sécrétion fonctionnel et une membrane basolatérale (Vaananen, Zhao et al., 2000). La fonction physiologique principale des ostéoclastes est de dégrader la matrice minéralisée de l'os. Ceci implique la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite et la rupture protéolytique de la matrice organique qui est riche en collagène. Avant que les enzymes protéolytiques puissent atteindre et dégrader la matrice collagèneuse, les cristaux hydroxyapatite

doivent être dissous. L'ostéoclaste résorbe l'os par la production d'enzymes protéolytiques et des ions d'hydrogène dans le microcompartiment créé entre la bordure en brosse et l'os (Figure 5). Des enzymes lysosomales sont aussi relâchées par les ostéoclastes couplés avec les ions d'hydrogène produits par la pompe à proton ($H^+ATPase$), ils procurent un environnement optimal à ces enzymes protéolytiques pour dégrader l'os. L'extrusion de protons à travers la bordure en brosse de la cellule nécessite la présence d'échanges d'ions, et des canaux pour maintenir un équilibre électrochimique dans l'ostéoclaste. Ceci inclus : un échangeur Na^+/H^+ , une $Na^+/K^+ ATPase$, un échangeur HCO_3^-/Cl^- , une $Ca^{2+} ATPase$, et des canaux K^+ (Mundy, 1996). L'ostéoclaste est une cellule très mobile et son attachement sur la matrice osseuse, étape indispensable à la résorption, se fait par l'intermédiaire de podosomes identiques aux points de contacts focaux décrits dans les fibroblastes mobiles, et est constitué de taline et de vinculine reliés à des faisceaux d'actine (Miyachi, Hruska et al., 1990). D'une manière intéressante, la résorption ostéoclastique est contrôlée négativement par le calcium extra-cellulaire. L'augmentation du calcium intracellulaire désorganise les podosomes grâce auxquels l'ostéoclaste adhère sur l'os, entraîne le détachement de l'ostéoclaste de la matrice osseuse, et donc l'arrêt de la résorption, lorsque la concentration de calcium extra-cellulaire est identique à celle présente dans le microcompartiment acide situé entre la bordure en brosse et l'ostéoclaste (Miyachi, Hruska et al., 1990). Cette régulation négative de l'activité ostéoclastique par le calcium extra-cellulaire est donc un mécanisme autolimitant de la résorption. Ainsi, on peut dire que les points fondamentaux de la biologie de

Bipolarité morphologique et fonctionnelle de l'Ostéoclaste

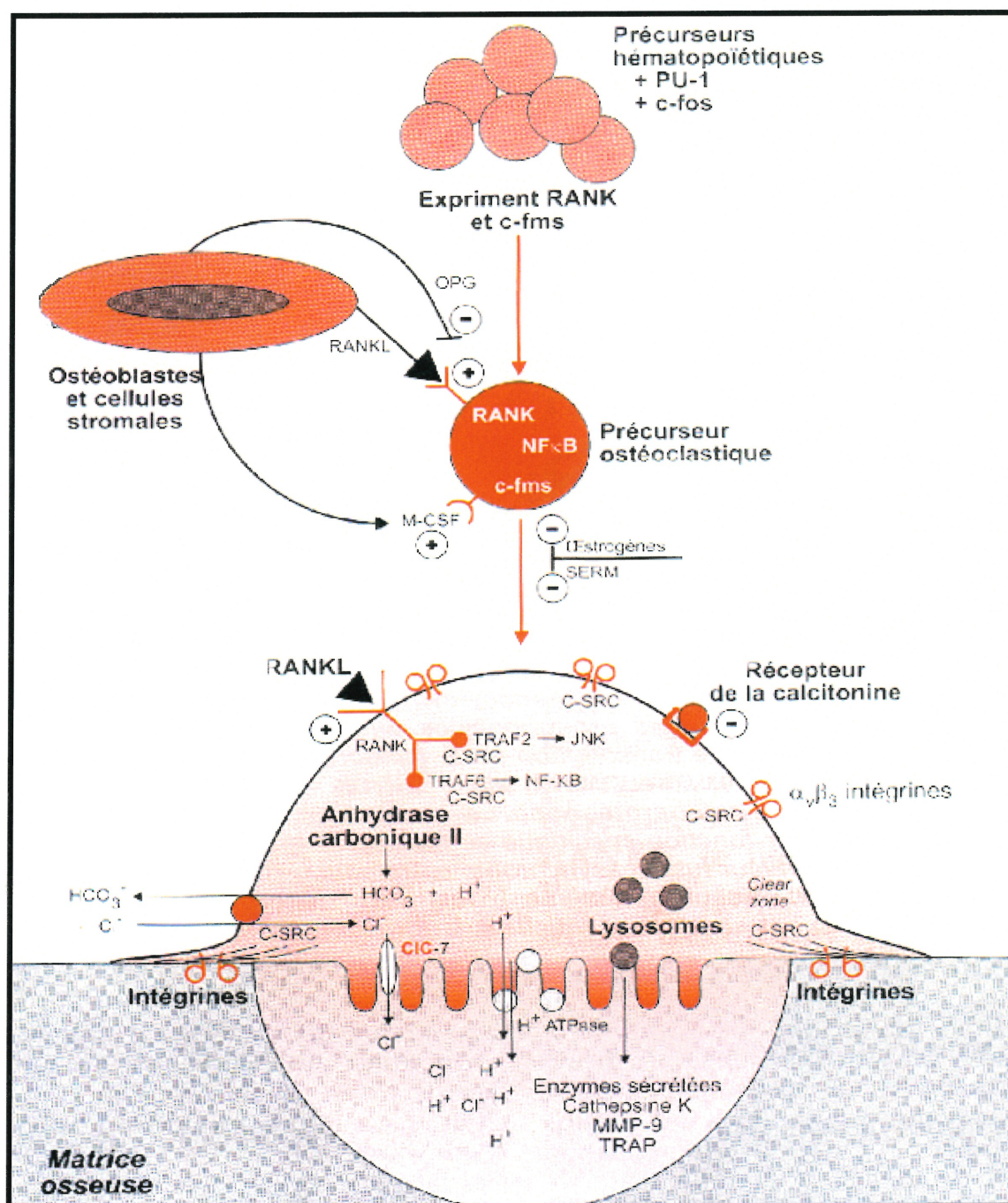


Figure 5 : Le pôle apical est en regard de la matrice osseuse; il comprend la zone scellée, et délivre dans la lacune de résorption enzymes et métalloprotéases dégradant la matrice. Cette bordure en brosse est aussi le siège d'une sécrétion spécifique de protons qui acidifient le compartiment de résorption osseuse. Le pôle opposé, ou pôle basolatéral, est en contact avec l'environnement de la moelle osseuse et du périoste. Il comprend un échangeur Na^+/H^+ pour excréter des protons et un échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ pour excréter des ions HCO_3^- ce qui acidifie le cytoplasme.

la résorption osseuse par l'ostéoclaste sont; (1) l'attachement de l'ostéoclaste sur la matrice osseuse qui permet de créer un microcompartiment entre la bordure en brosse sous l'ostéoclaste et l'os; (2) l'acidification et le relargage d'enzymes dans ce compartiment ; (3) la mise en évidence du mécanisme autolimitant qui permet l'arrêt de la résorption.

IV.3. LA REGULATION HORMONALE DU REMODELAGE OSSEUX :

Le métabolisme osseux est régulé par une variété d'hormones systémiques qui agissent sur les cellules responsables de la formation et de la résorption osseuse.

IV.3.1 HORMONE PARATHYROÏDIENNE :

Un des facteurs les plus important dans le remodelage osseux est la PTH. La PTH (hormone parathyroïdienne) est un polypeptide qui a un poids moléculaire de 9500 (Canalis, Centrella et al., 1989; Canalis, 1994). Il stimule la résorption osseuse, même si l'effet n'est pas direct sur les cellules ostéoclastes car ils n'ont pas de récepteurs à la PTH; il agit via les cellules ostéoblastes qui eux possèdent des récepteurs. La PTH a un effet complexe sur la formation osseuse : elle peut stimuler ou inhiber la synthèse du collagène et de la matrice osseuse. Ainsi, des traitements chroniques avec la PTH résultent en une inhibition de la formation osseuse *in vitro*. En outre, Il a été démontré que le PTH a comme fonction d'inhiber l'OPG (osteoprotegerin) et de stimuler RANKL (receptor activator NF- κ B ligand) simultanément pour favoriser la formation et l'activation des ostéoclastes et

ainsi augmenter la resorption osseuse (Aubin 2000). De l'autre côté, des traitements intermittents avec la PTH produisent une stimulation de la synthèse du collagène et de la formation osseuse. Ces effets anaboliques de la PTH pourraient agir via des facteurs locaux comme IGF-1 (insulin-like growth factor-1) et possiblement le TGF- β (transforming growth factor- β) (Canalis, Centrella et al., 1989; Canalis, 1994). D'autres hormones polypeptidiques agissent aussi sur le remodelage osseux dont la calcitonine, l'insuline et le GH (growth hormone). La calcitonine (CT) est un peptide de 32 acides aminés avec un poids moléculaire de 3000. Il est connu pour son inhibition de la résorption osseuse, mais il n'a aucun effet sur la formation de l'os. L'insuline est produite par le pancréas et ne régule pas la résorption osseuse, mais stimule la synthèse de la matrice osseuse ainsi que la formation du cartilage (Canalis, 1980). Le GH cause une petite stimulation de la production d'IGF-1 dans les cellules squelettiques et de cette façon le GH pourrait réguler la formation osseuse (McCarthy, Centrella et al., 1989). En plus, le GH augmente l'absorption du calcium dans la région gastro-intestinale; cette action agit via une augmentation de la production de la vitamine D₃ et pourrait être importante dans la minéralisation osseuse.

IV.3.2. LA VITAMINE D :

La vitamine D joue un rôle principal dans l'homéostasie du calcium et du phosphate; il est essentiel pour le développement et le maintien de l'os. En effet, le rôle direct de la vitamine D dans la régulation des minéraux a été démontré grâce à la découverte du récepteur de la vitamine D dans les ostéoblastes et dans

les précurseurs des ostéoclastes. En plus, récemment il a été identifié dans les cellules ostéoclastes matures par l'analyse RT-PCR (Johnson, Grande et al., 1996; Mee, Hoyland et al., 1996). La vitamine D est obtenue par la diète et par l'action du soleil sur la peau; elle est inerte à son état initial et doit être activé pour exercer son activité biologique (Figure 6). La première étape de l'activation de la vitamine D est l'hydroxylation du carbone 25 qui se produit dans le foie et forme le 25-hydroxyvitamin D₃. En suite, la deuxième étape qui est la plus importante de la formation de la 1,25-(OH)₂D₃ à partir du 25-hydroxyvitamin D₃ est catalysé par l'enzyme 25(OH)D-1 α -hydroxylase et se déroule principalement dans le rein. La vitamine D, spécialement la forme polaire physiologiquement active qui est la 1,25-(OH)₂D₃ produit des changements morphologiques et physiologiques dans les cellules osseuses. La 1,25-(OH)₂D₃ stimule la formation de l'os en induisant la synthèse des protéines de la matrice et en favorisant l'apposition minérale. Par contre plusieurs études, incluant la plus récente sur les souris knock-out en VDR, ont démontré que la vitamine D n'est pas absolument essentielle pour le processus d'ossification. Apparemment, la vitamine D induit la minéralisation de l'os en augmentant le niveau de calcium et de phosphate dans le sérum. Le haut potentiel de régulation de l'homéostasie minérale par la 1,25-(OH)₂D₃ fait voir qu'elle est la plus appropriée des dérivés de la vitamine D pour une implication dans la minéralisation osseuse (St-Arnaud, 1996). D'autre part, la 1,25-(OH)₂D₃ maintient aussi le niveau normal de calcium et de phosphate dans le sérum en induisant la résorption osseuse par l'augmentation de l'ostéoclastogénèse et l'activité ostéoclastique. Toutefois, de fortes évidences suggèrent que

Biosynthèse de la 1,25(OH)₂D₃

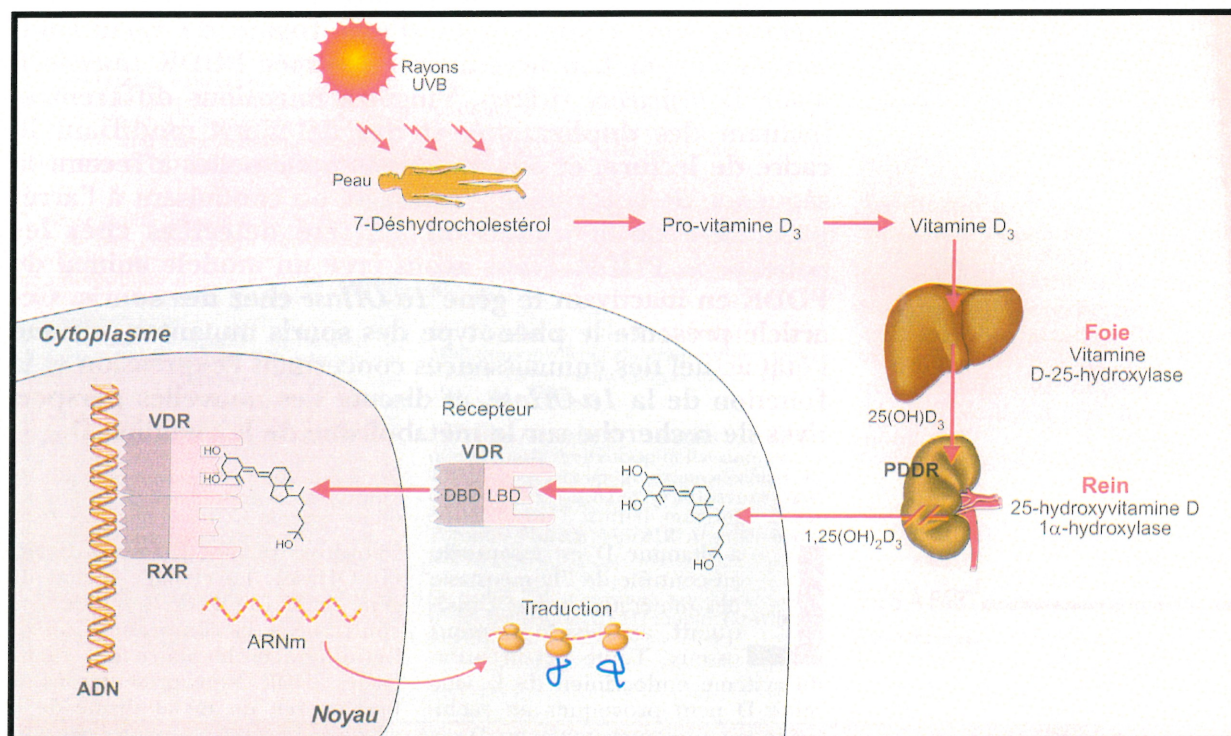


Figure 6 : La vitamine D, synthétisée suite à l'irradiation de la peau par les rayons solaires, est convertie en 25-hydroxyvitamine D₃ par la vitamine D 25 hydroxylase au niveau du foie. Ce métabolite inactif est ensuite métabolisé en 1α, 25-dihydroxyvitamine D₃ [1,25(OH)₂D₃] à la suite de l'action de l'enzyme rénale, la 25-hydroxyvitamine D-1α-hydroxylase (1α-OHase).

l'ostéoblaste et des substances dérivées des ostéoblastes sont nécessaires pour que la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ induise la résorption osseuse ostéoclastique (Brown, Dusso et al., 1999). En résumé, dans les ostéoblastes, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ augmente la synthèse des protéines osseuse de la matrice, la minéralisation osseuse, la synthèse des médiateurs de l'ostéoclastogénèse et l'activité ostéoclastique. En ce qui a trait aux cellules ostéoclastes, la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ augmente la résorption osseuse.

IV.3.3. LES FACTEURS DE CROISSANCE ET LES CYTOKINES :

L'os est riche en facteurs de croissance/cytokines qui ont une importante action dans la régulation de la formation et de la résorption osseuse. Les facteurs les plus importants localement sont : les IGFs, la famille du $\text{TGF-}\beta$, les FGFs (Fibroblast growth factors), les PDGFs (Platelet-derived growth factors), ainsi que les familles des cytokines comme les ILs (interleukines), les TNFs (Tumor necrosis factor) et les CSFs (colony-stimulating factor) (Canalis, 1996). Deux IGFs ont été caractérisés, l'IGF-I et l'IGF-II. Ils sont présents dans la circulation systémique et sont synthétisés par de multiples tissus, incluant l'os, où ils agissent comme des régulateurs locaux du métabolisme de la cellule. L'IGF-I et l'IGF-II ont des activités biologiques similaires, quoique dans l'os l'IGF-I est 4 à 7 fois plus actif que l'IGF-II (McCarthy, Centrella et al., 1989). *In vitro*, l'IGF augmente la synthèse du collagène et de la matrice, en plus il stimule la réplication des cellules ostéoblastes (Hock, Centrella et al., 1988). L'effet de IGF-I sur la synthèse de la matrice est en partie dépendante de l'augmentation du nombre de cellules, mais

l'IGF-I module directement le fonctionnement des ostéoblastes. L'IGF-I augmente la transcription du collagène de type I et diminue la transcription du MMP-13, une métalloprotéase, ce qui produit une inhibition de la dégradation du collagène (Canalis, Rydziel et al., 1995). En ce qui concerne le TGF- β , il stimule la réplication des précurseurs de la lignée des cellules ostéoblastes et a un effet direct dans la stimulation de la synthèse du collagène dans l'os (Centrella, McCarthy et al., 1987). Ainsi, le TGF- β module la synthèse de la matrice osseuse par plusieurs mécanismes, incluant une augmentation du nombre des cellules capables d'exprimer le phénotype ostéoblastique, ainsi que l'action directe du fonctionnement des ostéoblastes. Le TGF- β décroît aussi la résorption osseuse, possiblement en induisant l'apoptose des ostéoclastes (Pfeilschifter, Seyedin et al., 1988). D'autres facteurs impliqués dans la formation osseuse sont les FGFs. En effet, les FGFs acides ou basiques stimulent la réplication de la cellule osseuse, ce qui produit une augmentation de la population capable de synthétiser le collagène. Donc, l'administration systématique du FGF, surtout du basique, cause une augmentation du nombre des pré-ostéoblastes suivi par un recrutement des ostéoblastes et une augmentation de la formation osseuse. En fin, en ce qui a trait aux cytokines comme; les ILs, les CSFs et les TNFs, stimulent la résorption osseuse en augmentant le recrutement des ostéoclastes (Canalis, 1996).

V LE TISSU OSSEUX ARTHROSIQUE :

On a vu précédemment les prérequis de la formation et de la dégradation de l'os. Dans cette section on va se concentrer sur l'os sous-chondral arthrosique et ce qui permet de le différencier de l'os normal.

V.1. L'OS SOUS-CHONDRAL ARTHROSIQUE :

L'arthrose (OA) est une maladie dégénérative très commune avec une progression lente qui atteint les articulations via une atteinte de la membrane synoviale affectant en même temps le cartilage articulaire et l'os sous-chondral (Howell, 1982). Il a été proposé que la progression de l'arthrose commence par un changement dans la structure du cartilage articulaire, par l'apparition d'une érosion et une fibrillation de la zone superficielle et s'étendant jusqu'à la zone transitionnelle. Tout ceci amènerait à produire un épaissement de l'os sous-chondral (Buckwalter, Martin et al., 2000). Cependant, l'origine de la maladie n'est pas encore définie. En effet, une hypothèse plus récente suggère que l'os sous-chondral joue un rôle important dans la progression ou l'apparition de l'arthrose. Ainsi, deux hypothèses sont présentement proposées: 1) des stress mécaniques répétitifs sur les articulations peuvent contribuer à l'augmentation des microfractures sur le plateau de l'os sous-chondral. Pendant la lente érosion du cartilage articulaire, la sclérose du plateau sous-chondral progresse ce qui contribuerait possiblement à favoriser la perturbation mécanique du cartilage. 2) Des changements de l'os sous-chondral comme la sclérose pourrait précéder les dommages dans le cartilage chez l'OA. Même si la plupart des chercheurs ont

orienté leurs travaux sur le cartilage articulaire pour identifier les premiers changements dans l'OA (Bland, 1983), d'autres chercheurs ont concentré leurs efforts en étudiant le remodelage osseux de l'os sous-chondral pour établir s'il pouvait être le premier événement pathogénique dans l'OA (Radin, Paul et al., 1970). En 1970, Radin et Paul furent les premiers investigateurs à proposer que l'épaississement de l'os sous-chondral, dû aux réparations des microfractures, pourrait être le premier événement pathogénique dans l'OA (Radin et Paul, 1970). Pour étudier cette hypothèse, ils ont fait des tests biomécaniques sur l'os sous-chondral en appliquant des charges excessives sur l'os sur des patients OA et normaux dans des conditions *in vitro*. Ils ont démontré que l'os OA, sclérosé, est moins souple, donc il est moins absorbant aux chocs reçus ce qui entraînerait que la pression produite sur l'os soit transférée au cartilage, entraînant la dégradation de celui-ci. Cette hypothèse a été secondée par l'expérience faite par Ewald et al (Ewald, Poss et al., 1982), qui ont remplacé l'os sous-chondral chez des chiens vivants avec du ciment méthacrylate qui étaient 2,6 fois plus épais que l'os normal. Après deux ans de tests, ils ont observé une perte uniforme du cartilage articulaire dans les régions des charges excessives de toutes les têtes fémorales des chiens expérimentés. D'autre part, Li et Aspden ont démontré que la sclérose de l'os sous-chondral dans l'OA est le résultat d'une augmentation de l'épaississement et non une augmentation de la densité minérale de l'os (Li et Aspden, 1997). En effet, l'association de l'épaississement de l'os sous-chondral avec un taux de minéralisation anormalement bas a été identifié chez des patients arthrosiques, (Grynpas, Alpert et al., 1991; Puzas, 1993) suggérant que

le dérèglement du remodelage osseux peut être une partie intégrale de l'OA. En fait, la sclérose serait le résultat d'une augmentation de la déposition de la matrice ostéoïde mais sans une minéralisation adéquate. Ainsi, l'équipe de Bailey et Mansell a démontré que l'os trabéculaire arthrosique de la hanche avait plus de collagène immature et de minéraux, mais aussi une diminution du rapport calcium/collagène indiquant une augmentation de la fonction osseuse et une réduction de la minéralisation dans ce tissu (Mansell et Bailey, 1998). Ces résultats suggèrent qu'il pourrait être dû à un défaut dans les cellules ostéoblastes. Par ailleurs, la résorption et la formation osseuse ne se déroulent pas aléatoirement; ils suivent un modèle précis, régulé par des hormones, des facteurs de croissance locaux et des cytokines. Donc, ces résultats nous amènent à croire que l'altération de l'os sous-chondral est intimement relié au processus de l'OA plutôt que simplement une conséquence de celle-ci (Moskowitz, 1999).

V.2. LA BIOCHIMIE DE L'OS ARTHROSIQUE :

La compréhension des changements biochimiques dans l'OA a fait des progrès rapides dans les dernières années. Les principaux pièges lors de l'interprétation des données biochimiques sont les problèmes de variabilité des sujets et la discrimination des changements associés avec l'arthrose de ceux associés avec l'âge. Ainsi, il a été récemment reporté que les cellules ostéoblastes de l'os sous-chondral dans l'arthrose montrent un métabolisme altéré de certains biomarqueurs spécifiques (Westacott, Webb et al., 1997; Hilal, Martel-Pelletier et al., 1998). Les ostéoblastes de l'os sous-chondral arthrosique

produisent moins d'AMP cyclique (adénosine monophosphate cyclique) en réponse à la PTH et au PGE₂ (prostaglandine E₂) ce qui n'est pas le cas dans les cellules normales (Hilal, Martel-Pelletier et al., 1998). D'autre part, il y a aussi une altération de la production de la phosphatase alcaline et d'ostéocalcine, qui sont les deux principaux marqueurs de ces cellules. En effet, en présence de vitamine D₃ il y a augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline ainsi qu'une augmentation de la libération d'ostéocalcine par ces cellules (Hilal, Martel-Pelletier et al., 1998). Un déséquilibre entre la production des protéines non-collagéniques et collagéniques, comme l'ostéocalcine, peut amener à une augmentation du volume de l'os sans aller de pair avec l'augmentation de la minéralisation osseuse. Certaines évidences ont démontré que les souris knock-out d'ostéocalcine ont une augmentation de minéralisation sans avoir d'effet sur la résorption osseuse (Ducy, Desbois et al., 1996). Ceci suggère que des niveaux élevés d'ostéocalcine dans l'OA peut être responsable d'une minéralisation anormale chez ces patients. Par ailleurs, il a été noté que la sclérose osseuse dans l'os sous-chondral arthrosique peut être lié à une dérégulation du système uPA/Plasmin (urokinase plasminogen activator/Plasmin), du IGF-1/IGFBP(IGF binding protein) et du TGF- β (Woolley, Crossley et al., 1977; Martel-Pelletier, 1997; Hilal, Martel-Pelletier et al., 1998; Hilal, Martel-Pelletier et al., 1999). En effet, ils pourraient influencer la production des collagénases ainsi que d'autres mécanismes protéolytiques, ce qui amènerait ultimement à promouvoir le remodelage et la dégradation de la matrice. Un exemple de cette hypothèse a été suggéré par Hilal et al (Hilal, Martel-Pelletier et al., 1998). En effet, ils ont

démontré que les ostéoblastes de l'os sous-chondral produisent des niveaux élevés d'IGF-1 et d'uPA et que le niveau du PAI-1 (plasminogen activator inhibitor) ne diffère pas significativement entre les OA et les normaux. En plus, d'autres expériences ont démontré que l'IGF-1 stimule l'activité basale de l'uPA. De cette façon, il pourrait causer une augmentation de la formation osseuse, et produire une plus grande rigidité de l'os (Lajeunesse, Hilal et al., 1999). Des expériences faites chez des animaux ont aussi démontré l'implication de l'os sous-chondral dans l'arthrose. Par exemple, l'étude faite par Carlson et al (Carlson, Loeser et al., 1996) chez des primates a démontré qu'il y a une corrélation entre l'épaississement de l'os sous-chondral et la sévérité de l'arthrose. En effet, leurs résultats démontraient que lorsque le plateau sous-chondral avait moins de 400µm d'épaisseur, il n'y avait pas de lésions dans le cartilage. Par contre, lorsqu'il est plus épais que 400µm le cartilage avait une sévère arthrose. Une récente étude chez les babouins a démontré une dépendance à long-terme du cartilage articulaire de l'os sous-chondral. En effet, une interruption de contact entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire résulte en une dégénération de celui-ci. Ces changements sont consistants avec ceux qui se produisent dans l'arthrose (Malinin et Ouellette, 2000). D'autre part, l'injection d'acide monoiodoacétique dans les genoux de rats a démontré que les changements dans les propriétés de l'os et du cartilage se passent simultanément (Saied, Cherin et al., 1997). En outre, il y a aussi eu une étude chez les lapins comparant l'effet d'une force de pulsation de 500-msec, appliqué répétitivement sur les membres inférieurs des lapins, à une force de magnitude égale mais survenant

sur une durée de 50-msec. Utilisant la résorption de la tétracycline et le pyrophosphate ^{99}Tc , il a été démontré que le remodelage de l'os sous-chondral était initié plus rapidement lors de l'utilisation de pulsations plus rapides (Radin, 1985). Ils ont aussi analysé les changements dans le métabolisme du protéoglycane du cartilage et ceci a démontré que les cartilages articulaires qui ont reçu les pulsations de 50-msec avaient un changement significatif, mais que ces changements se passent après les changements dans l'os. D'autres tests ont été faits par la même équipe et toutes leurs observations démontrent que les changements métaboliques ou inflammatoires dans le cartilage ou la membrane synoviale suivent les changements mécaniques qui se déroulent premièrement dans l'os et ensuite dans le cartilage (Radin, 1985).

Pour conclure, on peut dire que le déséquilibre dans la capacité de réparer ainsi que le dommage causé au cartilage dû à l'épaississement du plateau sous-chondral, conduit à une progression anormale du cartilage et éventuellement à l'arthrose. La progression lente de l'arthrose peut ainsi être expliquée. On sait par ailleurs à présent que des facteurs provenant spécifiquement des ostéoblastes sont impliqués dans la maladie de l'arthrose (Pelletier, 2001). Par contre, la séquence des événements, à savoir si l'arthrose débute dans l'os ou le cartilage, reste encore controversée, et seules des expériences futures pourront démontrer où se situe la source de la maladie.

VI LES EICOSANOÏDES :

Une inflammation aiguë est caractérisée par de la douleur, de la rougeur, de l'œdème, de la chaleur, et éventuellement la perte de la fonction de l'endroit affecté. Il y a beaucoup d'évidences indiquant que ces événements, ainsi que d'autres processus physiologiques, agissent en partie via des médiateurs dérivés des lipides, comme les eicosanoïdes et les facteurs activés par les plaquettes (PAF) (Serhan, 2001). Les eicosanoïdes sont formés de 20 carbones et sont dérivés de l'acide arachidonique ainsi que d'autres acides gras; ces composés sont physiologiquement et pharmacologiquement divisés en prostaglandines (PGs), leukotriènes (LTs), lipoxines (LXs) et acides époxyéicosatétranoïque (EETs) (Serhan, 2001). Plusieurs études ont été concentrées sur les composés dérivés des acides arachidoniques car leurs activités biologiques sont observées dans une variété très large de tissus.

VI.1. L'ACIDE ARACHIDONIQUE :

L'acide arachidonique est un acide gras qui provient de la diète alimentaire où il est synthétisé par l'acide linoléique qui est un acide gras essentiel du corps. L'acide arachidonique est conservé dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires et il est estérifié en phospholipides comme la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylinositol. Une étape déterminante de la biosynthèse des eicosanoïdes est la libération ou la déacylation de l'acide arachidonique des sources estérifiées (i.e. des sites de la membrane de stockage) par des phospholipases spécifiques. Une de ces enzymes est la phospholipase

A₂ (PLA₂). Les deux classes les plus importantes de PLA₂ sont; le PLA₂ de sécrétion (sPLA₂) et le PLA₂ cytosolique (cPLA₂). La forme cytosolique de PLA₂ fût l'une des premières impliquée dans la libération de l'acide arachidonique de la membrane nucléaire de la cellule (Marshall et Roshak, 1998). Une fois la libération de l'acide arachidonique amorcée, il peut être métabolisé via la présence ou l'absence des enzymes de conversion, comme les cyclooxygénases (COX-1 ou COX-2) ou les lipoxygénases, et par la suite des synthétases spécifiques qui convertissent les produits des lipoxygénases et cyclooxygénases en eicosanoïdes biologiquement actives. L'acide arachidonique est converti en PGs par l'action initiale des cyclooxygénases et les LTs et LXs sont formés par l'action initiale des lipoxygénases.

VI.2. LES PROSTAGLANDINES :

Les prostaglandines sont trouvées dans une grande variété de tissus humains ainsi que chez des animaux primitifs (Mead, 1986). Les prostaglandines non seulement jouent un rôle central dans l'inflammation, mais régulent aussi d'autres réponses physiologiques qui sont critiques. Chez l'humain, les prostaglandines sont impliquées dans diverses fonctions, incluant la coagulation sanguine, l'ovulation, l'initiation de l'accouchement, le métabolisme de l'os, le développement et la croissance du nerf, la fonction rénale, et la réponse immunitaire (Dubois, Abramson et al., 1998). Les prostaglandines sont synthétisées par une grande étendue de tissus et servent comme des médiateurs autocrines ou paracrines pour signaler des changements dans l'environnement

immédiat. Les prostaglandines sont formées à partir de l'acide arachidonique par l'action initiale des cyclooxygénases ainsi que des prostaglandines endopéroxydes synthases (PGHS). L'activité de la peroxydase et de la COX ensemble catalysent l'insertion d'oxygène et le réarrangement du squelette de carbones pour former les endopéroxydes PGG₂ et ensuite le PGH₂, ce dernier agissant comme substrat pour les différentes synthases qui permet la production des prostaglandines (Figure 7) (Smith, Marnett et al., 1991).

VI.2.1. LA COX-1 et COX-2:

La cyclooxygénase (COX) est une enzyme qui contient le hème; il est plus abondant dans le réticulum endoplasmique et il catalyse deux réactions distinctes : 1) la cyclisation de l'acide arachidonique pour former le PGG₂ et 2) l'hydropéroxydation de PGG₂ pour produire le PGH₂ (Li, Smith et al., 1998). La COX peut être inhibée par les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) qui sont utilisés pour soulager les patients arthrosiques. D'autre part, la COX est le sujet de recherches très intensives pour avoir des médicaments plus sélectifs. Il a été reconnu, il y a plusieurs années déjà, que l'activité de COX n'est pas due seulement à une seule enzyme mais plutôt que deux ou peut être plusieurs isoformes d'enzymes seraient présentes (Needleman et Isakson, 1997; Herschman, 1998). Ainsi, il existe pour l'instant deux enzymes distinctes, COX-1 et COX-2. Les deux enzymes ont un poids moléculaire de 70-71kDa et la séquence d'acides aminés de COX-2 démontre une homologie de 60 % avec la séquence de COX-1 (Vane, 2001). La COX-1 est une enzyme

Biosynthèse des prostaglandines

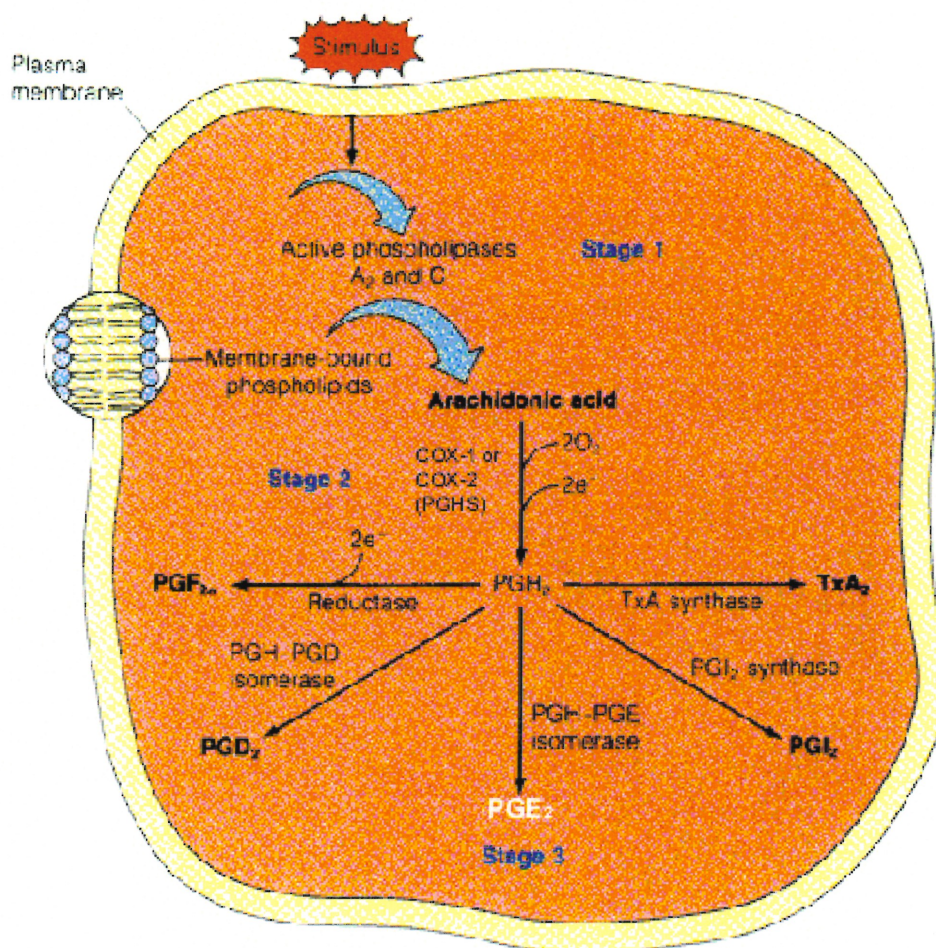


Figure 7 : Les prostaglandines sont formées à partir de l'acide arachidonique par les COXs (PGHS). Ces enzymes catalysent l'insertion de l'oxygène et les réarrangements des carbones.

constitutive qui est nécessaire pour la formation basale des prostaglandines, par contre COX-2 peut être induite par une grande variété d'agents comme des cytokines (ex : IL-1 beta, TNF alpha), des facteurs de croissance (IGF-1, FGF) ainsi que des promoteurs de tumeurs (Yamamoto, Yamamoto et al., 1998). Ces deux enzymes sont responsables essentiellement de la même réaction catalytique. D'autre part, il a été déterminé que les différentes isoformes de COX ont un rôle fonctionnel dépendant de l'expression de l'isoforme dans les tissus. La plupart des tissus normaux expriment COX-1 et ont un niveau bas d'expression de COX-2. Par contre, COX-2 est exprimée constitutivement dans le cerveau et les reins des rongeurs. Une autre différence qui existe entre COX-1 et COX-2 est l'utilisation de différents substrats d'acide arachidonique, étant donné qu'ils sont situés dans différents tissus, ainsi que l'instabilité du ARNm (ARN messenger) de chaque composé (Kutchera, Jones et al., 1996; Reddy et Herschman, 1996). Par exemple, dans les fibroblastes et les cellules immunitaires, COX-2 est capable d'utiliser de l'acide arachidonique endogène mais pas COX-1; dans ce système COX-1 a besoin que le substrat soit exogène. En plus, le COX-1 est surtout fonctionnel dans le réticulum endoplasmique, par contre l'activité de COX-2 est principalement détecté dans le noyau. Ces résultats suggèrent que ces deux isozymes représentent séparément et indépendamment les systèmes biosynthétiques opérationnels des PGs. Conformément à cette hypothèse, COX-1 produit constitutivement des prostaglandines comme médiateurs extracellulaires et COX-2 peut être active seulement dans certaines circonstances pour produire des PGs dans le noyau pour possiblement influencer des processus comme la

division cellulaire, la croissance, et la différenciation (Serhan, 1996). Dans un autre ordre d'idée, il a été démontré que les souris knock-out en COX-1 démontrent une réduction de fertilité, d'agrégation des plaquettes et ainsi qu'une réduction de la sensibilité envers l'acide arachidonique ce qui induit une inflammation des oreilles chez ces rongeurs. Par contre, les souris déficientes en COX-2 donnent une réponse normale à l'inflammation avec l'acide arachidonique exogène mais démontrent une augmentation de l'incidence de péritonite suppurative (Morham, Langenbach et al., 1995). Ce qu'on peut ressortir de tout ceci c'est un paradigme dans lequel l'isoforme COX-1 est essentiellement responsable pour la biosynthèse des PGs impliqués dans la régulation homéostatique, et que la deuxième isoforme, COX-2, est principalement impliquée dans la production des PGs en réponse à un vaste spectre de changements environnementaux et de stimulus internes. D'autre part, la COX-1 et la COX-2 ont toutes deux été documenté dans le tissu osseux et sont présentes dans les ostéoblastes (Mundy, 1993; Boyce, 1999).

VI.3. LES LEUKOTRIÈNES :

Les leukotriènes ont été découvert dans les années 70 et ils portent ce nom parce qu'ils ont été isolés des leucocytes et contiennent trois doubles liaisons (une structure triène) (Holgate, 1997). Les leukotriènes sont formés à partir de l'acide arachidonique par l'action initiale de l'enzyme 5-lipoxygénase (5-LO). Cette enzyme catalyse deux réactions séquentielles : (a) l'insertion d'une molécule d'oxygène en position 5 de l'acide arachidonique (en comptant à partir de la fin de

l'acide carboxylique) pour former le 5-HPETE et (b) la transformation subséquente du 5-HPETE en un époxyde nommé LTA₄. Le LTA₄ est une molécule relativement instable en l'absence d'un facteur stabilisant, donc il est rapidement transformé par l'enzyme LTA₄ hydrolase en LTB₄, où il est conjugué avec la glutathione pour former LTC₄ par la LTC₄ synthétase qui est une glutathione-S-transférase. Le LTC₄ à son tour peut être converti en LTD₄ et en LTE₄ par une élimination successive du résidu d'acide glutamique et des résidus de glycine. Ainsi, l'enzyme 5-lipoxygénase a un rôle principal dans la biosynthèse des leukotriènes (Figure 8) (Serhan, 2001).

VI.3.1 LA 5-LIPOXYGÉNASE :

En général, la biosynthèse des leukotriènes se déroule dans les leucocytes suite à une inflammation ou à une stimulation immunologique car ceux-ci sont les cellules principales qui les synthétisent. Les activités biologiques des leukotriènes, incluant la chémotaxie des leucocytes, la constriction des bronches, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la constriction artériolaire, et la dilatation de veinules post-capillaires, suggèrent un rôle pour les leukotriènes dans la pathophysiologie des réactions d'hypersensibilité et de l'inflammation (Samuelsson, 1983). En conséquence, la régulation de l'activité de la 5-lipoxygénase est récemment devenue un sujet très intéressant à considérer. Comme mentionné plutôt, la 5-LO est une enzyme qui fait partie de la grande famille des lipoxygénases et son rôle est de catalyser l'ajout d'une molécule d'oxygène à l'acide arachidonique. Elle est estimée à un poids moléculaire

Biosynthèse des leukotriènes

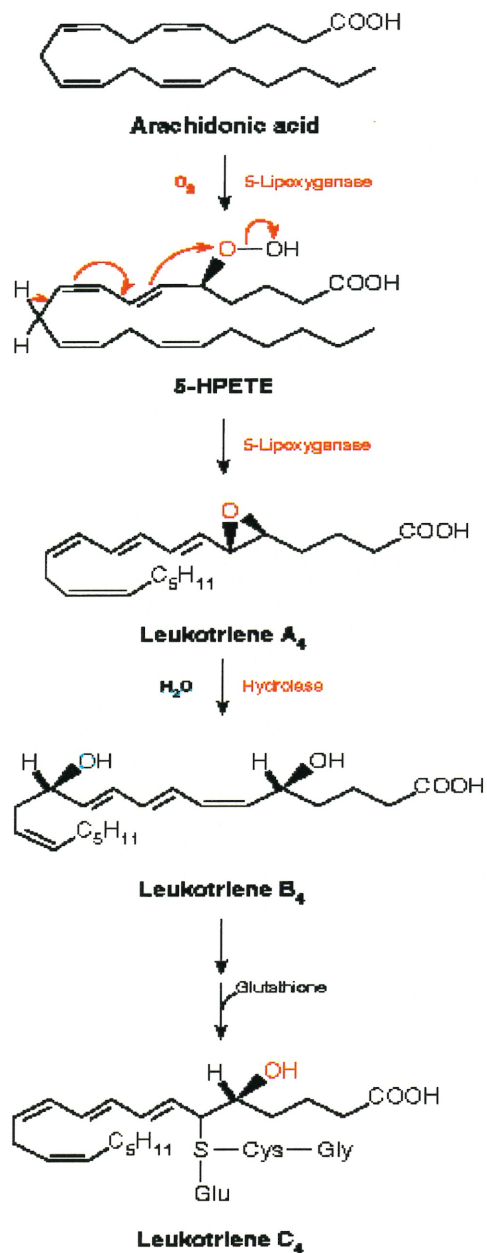


Figure 8 : Biosynthèse des leukotriènes à partir de l'acide arachidonique.

d'environ 77 839 et sa séquence d'acide aminés est de 673 résidus (Matsumoto, Funk et al., 1988). D'autre part, cette enzyme a besoin de calcium et d'ATP pour une activité maximale. En effet, l'ATP est nécessaire pour la phosphorylation de la molécule qui est indispensable pour la translocation de la 5-LO à la membrane nucléaire mais le rôle exact du calcium est encore inconnu (Silverman and Drazen, 1999). Une autre protéine importante à la transformation de l'acide arachidonique par la 5-LO est la FLAP (5-lipoxygenase associated protein). Cette protéine a comme fonction d'augmenter l'efficacité, avec laquelle l'acide arachidonique est présenté à la 5-LO dans la membrane nucléaire. La FLAP aurait aussi comme fonction de maintenir la conformation active de la 5-LO (Abramovitz, Wong et al., 1993). Ainsi, lors de l'activation des leucocytes, la 5-LO et cPLA₂ migrent à la membrane nucléaire, la cPLA₂ libère l'A.A. de la membrane nucléaire et il est transféré à la 5-LO via la FLAP. La présence de leukotriènes dans le tissu osseux est basée sur des évidences indirectes et il n'y a pas de données claires que les deux enzymes, 5-LO et FLAP, responsable de la synthèse des leukotriènes, soient présentes dans les ostéoblastes (Abramovitz, Wong et al., 1993). Ainsi, il n'y a aucune donnée solide sur la synthèse de leukotriènes par les ostéoblastes.

VI.3.2 LE LTB₄:

Le LTB₄ est connu depuis une vingtaine d'années comme un des plus puissant chémoattractants pour les leucocytes. Le LTB₄ joue un rôle important dans la défense contre les infections bactériennes en recrutant les leucocytes aux lésions infectieuses (Yokomizo, Masuda et al., 2000). Le LTB₄ est aussi connu

comme un candidat pour l'initiation et la progression de plusieurs maladies inflammatoires incluant l'arthrite, l'asthme, le psoriasis, et la néphrite ischémique. Le leukotriène B₄ est un métabolite de l'acide arachidonique, il est un activateur puissant des réponses fonctionnelles des neutrophiles (i.e. la génération des radicaux d'oxygène libres et la libération des enzymes lysosomiaux), et il est l'un des premiers signaux important qui amène la migration des neutrophiles aux sites d'inflammation. De cette façon, l'activation des neutrophiles génèrent et libèrent plus d'eicosanoïdes, et donc stimule l'inflammation. Le LTB₄ n'induit pas directement la douleur mais diminue le seuil pour d'autres stimulateurs (Serhan, 2001). Le LTB₄ est une petite molécule lipide qui est composé de 20 carbones et deux groupes hydroxyles. On croit qu'il agit par un récepteur de surface qui fait partie de la famille des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR), le BLT1. Très récemment, il y a eu l'identification d'un deuxième récepteur de surface de LTB₄ (BLT2) (Yokomizo, Kato et al., 2000). Le BLT2 a une homologie de 45% d'identité des acides amines avec le BLT1. Le BLT2 a une basse affinité comme récepteur pour le LTB₄ comparé au BLT1, mais il traduit très efficacement les signaux intracellulaires en réponse au LTB₄. La distribution de ces récepteurs dans les tissus est très différente entre BLT1 et BLT2. Le BLT1 est exprimé majoritairement en périphérie des leucocytes avec un faible expression dans le thymus et dans la rate. Au contraire, le BLT2 est exprimé dans la plupart des tissus avec une très haute expression dans la rate, suivi du foie, de l'ovaire et des leucocytes (Yokomizo, Izumi et al., 2001). D'autre part, un récepteur nucléaire orphelin, le PPAR α a été aussi démontré comme un récepteur qui peut lier le LTB₄

et activerait la transcription de gènes qui mettrait fin à l'inflammation (Devchand, Keller et al., 1996). Donc, le LTB₄ est un des rares ligands qui utilise un système de double récepteur. Puisque, des expériences ont démontré que les leukotriènes, spécifiquement le LTB₄, joue un rôle important dans les maladies inflammatoires, il serait avantageux de trouver un antagoniste à ces récepteurs ou des inhibiteurs de sa synthèse pour diminuer l'effet du LTB₄ dans ces maladies. En effet, des expériences ont démontré que le LTB₄ stimule la résorption de l'os en augmentant la formation des ostéoclastes et en activant les ostéoclastes matures (Garcia, Boyce et al., 1996). D'autre part, des résultats ont suggéré que le LTB₄ soit impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules ostéoblastiques et pourrait interagir avec les prostaglandines pour moduler ces effets (Ren et Dziak, 1991). Tous ces résultats démontrent une certaine implication dans la formation et la dégradation de l'os, ce qui amène à croire qu'il serait possiblement impliqué dans l'arthrose.

VII LES ANTI-INFLAMMATOIRES :

Il existe deux types d'anti-inflammatoires utilisés en thérapeutique : les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS). Dans ce mémoire nous allons nous consacrer aux AINS étant donné qu'ils sont le plus souvent utilisés dans les maladies arthrosiques. Les AINS comme le piroxicam, l'indométacine, et le sulindac sont le plus souvent utilisés comme remède; ce sont des anti-inflammatoires, des antipyrétiques et des analgésiques, et sont les premiers traitements choisis pour les maladies rhumatismales. Le

mécanisme d'action de ces AINS est l'inhibition des deux cyclooxygénases 1 et 2. Par conséquent, cette inhibition produit l'arrêt de la production des prostaglandines, qui eux possèdent des propriétés inflammatoires. Les AINS cependant ont des effets secondaires et provoquent souvent des problèmes rénaux, intestinaux, de pression artérielle, et des troubles cardiaques.

VII.1. LES EFFETS SECONDAIRES DES AINS :

Il a été proposé que les effets secondaires des AINS soient attribués à l'inhibition de COX-1 qui est l'enzyme exprimée constitutivement, et que l'action anti-inflammatoire des AINS est due à l'inhibition de COX-2. Nous savons que l'action des AINS passe par la régulation des COX et que ceci est la base de son effet adverse sur le rein. Dans des conditions normales, le rôle des PGs dans le maintien de la fonction rénale est assez restreint. Par contre, sous des conditions de stress, quand le système rénine-angiotensine est activé et que la libération de catécholamine augmente, le rein devient de plus en plus dépendant des effets vasodilatateurs des prostaglandines pour maintenir le flot sanguin rénal (renal blood flow : RBF) et la filtration glomérulaire (GFR). Conséquemment, durant l'induction de la vasoconstriction produite par l'angiotensine II ou les catécholamines, l'inhibition par des AINS sur l'action des prostaglandines résulte en une baisse de RBF et de GFR, qui peut produire une ischémie rénale. Par la suite, une insuffisance rénale aiguë peut se produire, nécessitant un remplacement rénal. Des effets néfastes des AINS sur la pression sanguine ont aussi été démontrés (Johnson, 1998). En effet, chez les personnes âgées

normales qui utilisent des AINS, il y a 1.7 fois plus de chance de développer de l'hypertension. Les AINS affectent aussi principalement la synthèse de l'endothelin-1 rénale (ET-1). Normalement, les prostaglandines vasodilatatrices inhibent la synthèse de ET-1. Donc, l'inhibition de la synthèse des prostaglandines facilite l'augmentation de la synthèse de ET-1 et ceci causerait l'augmentation de la rétention de l'eau, des sels et de la résistance vasculaire périphérique. Ces facteurs produisent une augmentation de la pression sanguine et causent l'hypertension.

Un des effets secondaires le plus documenté des AINS est la perforation gastrique. Normalement, dans l'appareil digestif le PGE₂ réduit la sécrétion des acides gastriques, exerce une action directe vasodilatatrice sur les vaisseaux sanguins dans la muqueuse gastrique et stimule la production de mucus qui forme la barrière protectrice (Whittle, 1987). En ce qui concerne l'arthrose, certaines recherches ont prouvé que les AINS pouvaient accélérer le processus de destruction du cartilage chez les patients arthrosiques. En effet, l'indométacine inhibait la synthèse des protéoglycanes dans le cartilage, le méloxicam inhibait l'activité des leucocytes polymorphonucléaires et le péroxicam, tolmelin, méloxicam, sulindac et méclofenate n'avaient aucun effet sur l'activité de la collagénase. La combinaison de l'inhibition de la synthèse de protéoglycane et l'absence d'effet sur la collagénase permettrait l'accélération de la destruction du cartilage dans l'OA (Rainsford, 1999). Conséquemment, les compagnies pharmaceutiques se sont tournées vers la production d'un inhibiteur sélectif pour

la COX-2 ce qui a permis de réduire les effets secondaires mais pas de les éliminer.

VII.2. LES INHIBITEURS DOUBLES :

L'inhibition des COXs entraîne, d'autre part, une augmentation du taux de conversion de l'acide arachidonique par la 5-lipoxygénase ce qui augmenterait la quantité de leukotriènes dans le milieu biologique (Rainsford, 1993; Dyer, 1997; Laufer, 2001). Ainsi les inhibiteurs doubles avec une efficacité améliorée et une réduction des effets secondaires pourraient dépasser facilement les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (Carty, 1988). Plusieurs, composés chimiques distincts sont dans différentes phases de développement précliniques ou cliniques. Il en existe 13 pour le moment : BF-398, RWJ63556, PGV20229, tepoxalin, BW7556, CI-986, SK&F105809, FPL62064, PD127443, PD137968, L-652.343, CBS-1108, ML3000 (Celotti, 2001), mais aucun de ces composés n'est présentement sur le marché. Les résultats de laboratoire obtenus avec ces composés sont très révélateurs car ils ont une très grande efficacité comme anti-inflammatoire avec en plus une absence presque totale de toxicité gastrique. Un des composés possédant peu d'effets secondaires est le ML-3000 aussi appelé licofélone. La licofélone, [2,2-dimethyl-6-(4-chlorophenyl)-7phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-5-yl]-acetic acid, est un pyrrolizine polysubstitué qu'inhibe de manière similaire COX et 5-LO (Figure 9) (Fiorucci, Meli et al., 2001). Des études pharmacologiques *in vitro* avec des tissus humains et d'animaux et *in vivo* chez des animaux ont déterminé que la licofélone n'était pas sélective pour aucune des isoformes des

Mécanisme d'inhibition des eicosanoïdes par la licofélone

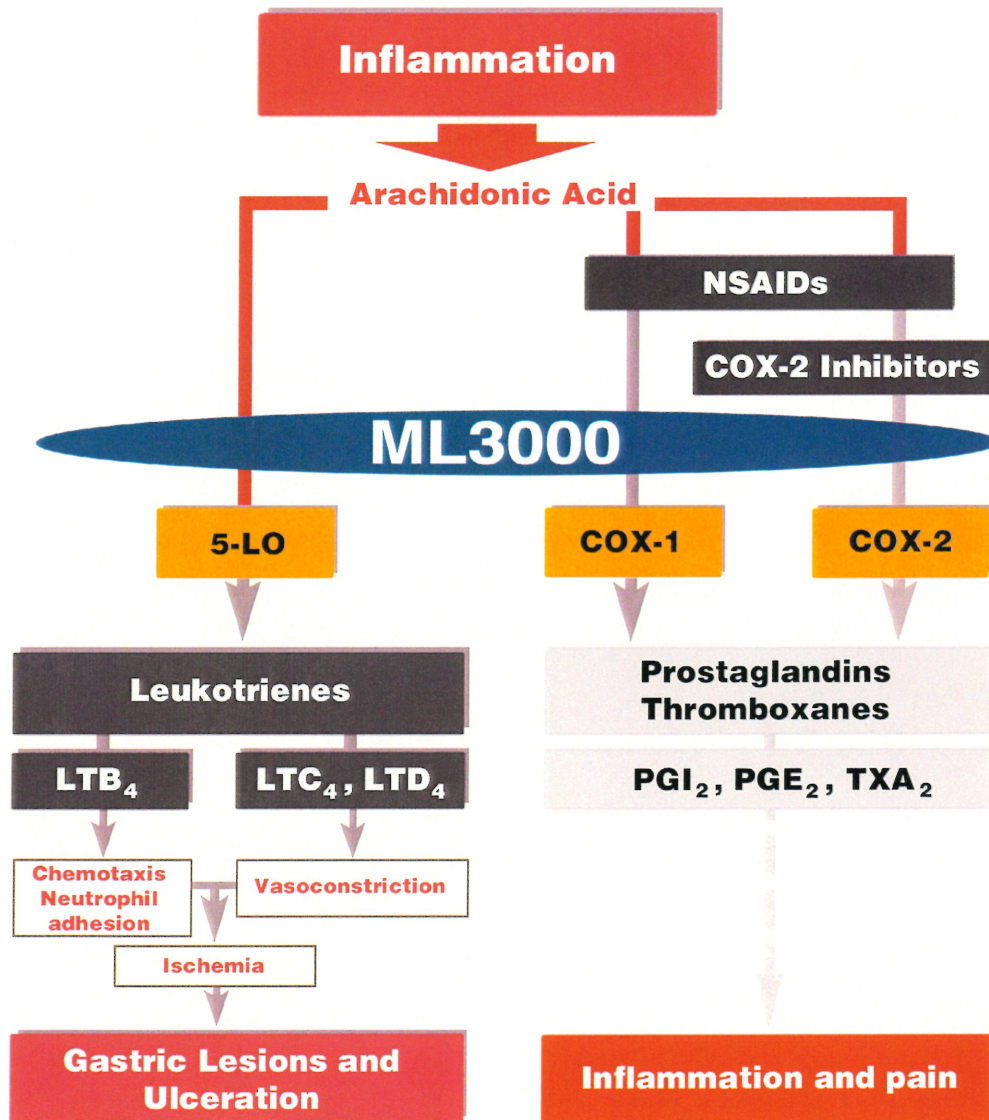


Figure 9: L'inhibition de COXs amène l'augmentation de la production des leukotriènes qui produisent des lésions gastriques et des ulcères d'estomac. L'inhibition double de la 5-LO et de COXs par le licofélone (ML-3000) prévient ce court-circuit.

COXs (Laufer, 1994). La détermination du mécanisme d'action de la licofélone a été faite par Laufer et Tries (Laufer, Tries et al. 1994) et Laufer a démontré que la similitude avec l'acide arachidonique étant presque parfaite, la licofélone inhibe la 5-LO en agissant comme un substrat analogue (Laufer, 2001). En ce qui concerne les COXs, la licofélone représenterait aussi un substrat analogue. La licofélone a des propriétés similaires aux autres AINS car c'est aussi un analgésique, un anti-inflammatoire et un antipyrétique. Par contre, il possède des différences assez significatives qui permettent une meilleure efficacité contre l'inflammation et la douleur, et ses effets secondaires sont presque nuls. Ainsi, la licofélone de la même façon que le diclofénac et l'indométacine (des AINS classiques) réduit la formation des prostaglandines dans l'estomac, cependant il ne permet pas le court-circuit vers les leukotriènes. Ce court-circuit produit par les AINS classiques accroît la formation de leukotriènes ce qui entraîne des lésions gastriques plus graves. Les résultats obtenus pour la licofélone ont été confirmés par des études pré-cliniques. En plus, la licofélone est une des molécules d'inhibition double qui a été le plus étudié et est présentement en phase III du développement clinique (Laufer, 2001).

En résumé, les inhibiteurs doubles, comme la licofélone, représentent un avantage très significatif lors du traitement des maladies arthrosiques : 1) la même molécule inhibe les deux COXs et la 5-LO, 2) l'inhibition de deux isoformes de COX augmente l'efficacité de l'anti-inflammatoire, 3) l'inhibition simultanée de la 5-LO prévient la pro-inflammation et les lésions gastro-intestinales par les

leukotriènes. Puisque la licofélone surpasse les autres inhibiteurs doubles dans les recherches effectuées jusqu'à présent, il représenterait la prochaine thérapie alternative pour le traitement des maladies rhumatismales.

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE :

L'arthrose est une maladie dégénérative de l'articulation et elle est un des problèmes médicaux le plus fréquent et symptomatique surtout chez les personnes âgées. L'arthrose est une maladie assez bien définie par contre on ne connaît pas encore complètement l'étiologie, la pathogénèse et la progression de cette maladie. Elle progresse lentement et elle est décrite comme une dégradation et une perte du cartilage articulaire accompagnée par des changements hypertrophiques de l'os avec une formation d'ostéophytes ainsi que l'épaississement de l'os sous-chondral. Son traitement actuel se limite au remplacement des articulations atteintes (genou, hanche) si la maladie est très avancée ou à calmer les douleurs chez les patients en phase initiale. L'utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) soulage la douleur chez les patients arthrosiques mais ont des effets secondaires très néfastes. Ces médicaments inhibent la production des prostaglandines en agissant sur les cyclooxygénases, mais ceci pourrait produire un court-circuit vers l'activation des lipoxgénases qui produisent des leukotriènes. Notre but de recherche est donc de :

- 1) Déterminer si les ostéoblastes produisent des leukotriènes, en particulier le LTB_4 , et si les ostéoblastes arthrosiques en produisent plus que les normaux.
- 2) Déterminer l'efficacité d'un nouvel AINS, la licofélone (ML-3000), un inhibiteur double des COX et de 5-LO.
- 3) Déterminer le rôle potentiel de LTB_4 sur les marqueurs cellulaires des ostéoblastes normaux et OA.
- 4) Déterminer si une augmentation de la 5-LO se produit en réponse à l'inhibition chronique de la COX-2 dans les ostéoblastes OA.
- 5) Si l'objectif 4 est atteint, déterminer quelle

enzyme, 5-LO et/ou FLAP, participe à l'augmentation de la production des leukotriènes dans les ostéoblastes OA. Notre approche va donc nous permettre de déterminer le rôle potentiel des leukotriènes, et en particulier le LTB₄, sur les anomalies observées dans les ostéoblastes OA. De plus, nous pourrions déterminer si la voie de transformation de l'A.A. peut être court-circuitée vers les leukotriènes suite à une exposition prolongée aux inhibiteurs de COX-2, une situation clinique potentielle pour les patients arthrosiques.

B: MANUSCRIT

Arthritis & Rheumatism

Official Journal of the American College of Rheumatology

03/01/02

David S. Pisetsky, M.D., Ph.D.
Editor

Dr. Daniel Lajeunesse
Unité de Recherche en Arthrose
C.H.U.M., Pavillon Notre-Dame
Centre de recherche L.C. Simard
1560, rue Sherbrooke Est.
Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada

Fax: 514-412-7583
E-Mail: lajeunda@ere.umontreal.ca

RE: Manuscript # 01-0703-FL/RV


Dear Dr. Lajeunesse,

We are pleased to accept for publication in *Arthritis & Rheumatism* your manuscript entitled, "Study of the Role of Leukotriene B4 in Abnormal Function of Human Subchondral Osteoarthritic Osteoblasts: Effects of Cyclooxygenase and/or 5-Lipoxygenase Inhibition."

We have now instituted an electronic process to expedite the proofing of your manuscript. You will receive an email containing log-on information when your proofs are ready to be viewed on-line. If you have any questions or if you do not wish to view the proofs of your manuscript on line, please contact Jane Diamond, Managing Editor, and request that the proofs be mailed to you. She can be reached at:

The American College of Rheumatology
1800 Century Place, Ste. 250
Atlanta, GA 30345-4300
Phone 404-633-3777
Fax 404-633-1870
jdiamond@rheumatology.org

Sincerely,



David S. Pisetsky, MD, PhD
Editor

Arthritis and Rheumatism Editorial Office
Duke University Medical Center, Box 3806
2400 Pratt Street
Room 0311, Terrace Level
Durham, NC 27710

**Study of the role of leukotriene B₄ in abnormal function of human
subchondral osteoarthritic osteoblasts:
effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition.**

Yosabeth Paredes¹, Frédéric Massicotte¹, Jean-Pierre Pelletier¹, Johanne Martel-Pelletier¹, Stefan Laufer² & Daniel Lajeunesse¹

¹Unité de recherche en Arthrose, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada and ²Pharmaceutical Chemistry/Medicinal Chemistry Department, Eberhard-Karls-University Tübingen, Tübingen, Germany.

Supported in part by a grant from Merckle GmbH, Ulm, Germany and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, Équipe prioritaire en arthrose.

Running title: Role of leukotriene B₄ in human osteoarthritic osteoblasts.

Correspondence: Daniel Lajeunesse, Ph.D., Unité de recherche en Arthrose, CHUM, Hôpital Notre-Dame, 1560, rue Sherbrooke Est, Montréal (Québec) H2L 4M1 Canada, Telephone: (514) 890-8000 ext. 28914, Fax: (514) 412-7583, Email:

lajeunda@jonction.net

Key words: osteoarthritis, subchondral osteoblasts, leukotrienes, prostaglandin, cell biomarkers

ABSTRACT

Objective: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit the production of prostaglandins (PGs) by acting on cyclooxygenase (COX), but may lead to a shunt to the lipoxygenase (LO) pathway that produces leukotrienes (LTs). Compounds such as licofelone (ML-3000) are now targeting the inhibition of both COX and LO. Here, we compared the effect of licofelone, of a specific COX-2 inhibitor (NS-398), and a specific inhibitor of 5-LO activating protein (FLAP) (BayX-1005) on the production of leukotriene B₄ (LTB₄) and prostaglandin E₂ (PGE₂) and on cell biomarkers by human osteoarthritic (OA) subchondral osteoblasts (Ob).

Methods: Primary *in vitro* Ob cells were prepared from subchondral bone specimens from OA patients and from normal individuals at autopsy. LTB₄ and PGE₂ levels were measured by ELISA in conditioned media of Ob incubated or not with either licofelone, NS-398 or BayX-1005. The effect of these drugs on alkaline phosphatase activity and osteocalcin release by OA osteoblasts was also determined. The effect of exogenous LTB₄ addition on alkaline phosphatase activity and osteocalcin levels in both normal and OA Ob was also assessed. Lastly, the presence of LTB₄ receptors, BLT1 and BLT2, in normal and OA Ob was evaluated by Western blot analysis.

Results: OA subchondral Ob produced variable levels of PGE₂ and of LTB₄ compared to normal human Ob. Licofelone (0.8 to 8 μ M) inhibited the production of PGE₂ and LTB₄ by OA Ob by $61.2 \pm 6.4\%$ and $67.0 \pm 7.6\%$ respectively at the maximal dose. NS-398 reduced PGE₂ production by $75.8 \pm 5.3\%$ while BayX-1005 inhibited LTB₄ production in OA Ob by $38.7 \pm 14.5\%$ and marginally affected PGE₂ levels ($14.8 \pm 5.3\%$). Incubating OA subchondral Ob with 1,25(OH)₂D₃ increased alkaline phosphatase activity and

osteocalcin release, and licofelone dose-dependently stimulated 1,25(OH)₂D₃-induced alkaline phosphatase activity while it inhibited osteocalcin release. BayX-1005 partly reproduced this effect on osteocalcin and alkaline phosphatase activity, while NS-398 failed to affect these activities. LTB₄ dose-dependently (10⁻¹³ to 10⁻¹⁰ M) inhibited alkaline phosphatase activity in OA Ob while its effect on osteocalcin release depended on endogenous LTB₄ levels in these cells. In normal Ob, LTB₄ dose-dependently stimulated osteocalcin release, whereas it failed to influence alkaline phosphatase activity. Lastly, LTB₄ receptors BLT1 and BLT2 were present in normal and OA Ob.

Conclusion: OA Ob produce higher levels of PGE₂ and/or LTB₄ than normal Ob, and licofelone inhibits their production. Selective effects of licofelone on alkaline phosphatase activity and osteocalcin release is via its role on LTB₄ production. As LTB₄ can modify cell biomarkers in normal Ob and since abnormal bone cell remodeling may be involved in the onset and/or progression of OA, our results suggest licofelone could modify abnormal bone remodeling in OA.

Osteoarthritis (OA) is the leading cause of disability among the elderly population (1), yet we still do not fully understand the etiology, pathogenesis and progression of this disease (2,3). OA is a slowly progressing disease with a multifactorial origin. This disease can be described as the degradation and loss of articular cartilage, accompanied by hypertrophic bone changes with osteophyte formation and subchondral plate thickening (4,5). It includes changes in articular cartilage and surrounding bone, and an imbalance in loss of cartilage (due to matrix degradation) and an attempt to repair this matrix (4,5). Specific interactions between bone and cartilage have not been clearly defined in OA; however, there is mounting evidence to indicate a direct intervention of the bone compartment in the initiation/progression of OA (6-8).

Arachidonic acid (AA) is released from membrane phospholipids following the activation of phospholipase A₂ (PLA₂). Several enzymatic complexes can further metabolize AA into a number of prostanoids by specific syntheses in different cells (9), and osteoblasts mainly produce PGE₂ (10). 5-lipoxygenase (5-LO) catalyses the formation of leukotrienes (LT) from AA, the first compound formed is LTA₄, which rapidly converts into LTB₄ or LTC₄. LTC₄ can be further catalyzed into LTD₄ and LTE₄ (11,12). Conventional NSAIDs inhibit cyclooxygenases (COX-1 and/or COX-2), the key enzymes that metabolize AA into prostaglandins and thromboxanes (13,14). The reduction in prostaglandin and thromboxane is probably the basis for the anti-inflammatory and analgesic activity of NSAID widely used for the treatment of OA. However, side effects have limited the utility of these drugs. Most common side effects are gastrointestinal symptoms ranging from mild, such as dyspepsia and abdominal discomfort, to more serious events such as peptic ulcers to life threatening gastric/duodenal bleeding and perforation

(15). Indeed, long-term inhibition of COX could lead to a shunt to the 5-LO pathway, leading to the formation of LTs, which can induce gastric lesions and ulceration (16,17). Hence, NSAID targeting both the COX and 5-LO pathways may control the symptoms of OA without serious gastrointestinal side effects (16,17). Moreover, whether this shunt to the 5-LO pathway and the local production of leukotrienes in joint tissues is detrimental to tissues such as the subchondral bone compartment remains unknown.

Osteoblasts produce prostaglandins via both COX-1 and COX-2 activities (18,19). Prostaglandins stimulate bone resorption by increasing the number and activity of osteoclasts, PGE₂ being the most potent agonist (20). The role of a number of stimulators of the formation of tartrate-resistant acid phosphatase positive giant cells with osteoclast features are blocked by inhibiting endogenous PG synthesis (21-23). PGs also enhance bone formation by stimulating the replication and differentiation of osteoblasts along with an increase in the production of growth factors (24). In fully differentiated osteoblasts, high concentrations of PGs can inhibit collagen synthesis (25). PGs may also mediate the response to mechanical forces in bone, since bone formation stimulated by impact loading can be blocked by NSAIDs (26). Osteoblasts also synthesize LTs *in vivo*, albeit their *in vitro* production remains unknown. Moreover, the levels of PGE₂ and LTs observed *in vivo* in OA bone tissue are controversial (27,28), and the levels of LTs produced *in vitro* by OA osteoblasts have not been evaluated. Finally, whether LTs may modulate the activity of OA osteoblasts and/or be involved in OA pathogenesis remains to be determined.

The aim of this study is to explore the effect of the dual inhibition of COX (-1 and -2) and 5-LO using clinically relevant concentrations of licofelone compared to the specific inhibition of COX-2 or of 5-LO on the metabolism of OA subchondral osteoblasts.

Licofelone inhibits both COX-1, COX-2 and 5-LO (29,30). It also inhibits shunting to leukotrienes and leucocyte adherence, and shows better gastrointestinal tolerability (31-33). Here, we tested the effect of licofelone on the production of leukotriene B₄ (LTB₄) and prostaglandin E₂ (PGE₂), as well as on alkaline phosphatase activity and osteocalcin release by OA subchondral osteoblasts, two key biomarkers of normal osteoblast function.

MATERIALS AND METHODS

Patients and clinical parameters

OA specimens were obtained from a total of 34 patients (15 males, 19 females) aged 71.4 ± 11.5 years (mean \pm SD) undergoing total knee replacement surgery and classified as OA according to the criteria developed by the American College of Rheumatology (34). The exact number of patients used within each experimental setting is indicated in the Figure Legends. The subchondral bone plate was dissected from tibial plateaus under sterile conditions as described previously (35,36), and the specimens represented moderate-to-severe OA as defined according to macroscopic criteria (3.0 ± 0.5 on a scale of 0 to 4). Osteophytes were removed prior to processing. No patients had received medication for 6 months prior to surgery, including corticosteroids, which would interfere with bone metabolism. Normal subchondral bone specimens from tibial plateaus were collected at autopsy from a total of 8 individuals (7 males, 1 females) aged 57.6 ± 15.9 years (mean \pm SD). Before using a specimen, we ensured that the donor did not receive medication that could interfere with bone metabolism, had any bone metabolic disease and showed macroscopically normal cartilage. These samples were used to determine the levels of LTB_4 and PGE_2 produced by normal osteoblasts, and to determine the regulation of biomarkers by exogenous addition of LTB_4 .

Subchondral bone primary osteoblast cell cultures

The isolation of the subchondral bone plate was performed under a magnifying microscope to insure complete removal of cartilage and trabecular bone. Subchondral bone cell cultures were prepared as previously described (37,38) using three sequential digestions in the presence of 1 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

The digested bone pieces were cultured in BGJb media (Sigma-aldrich) containing 20% fetal bovine serum (FBS, Wisent Inc., St. Bruno, Québec, Canada). This medium was replaced every 2 days until cells were observed in the petri dishes. At this point, the culture medium was replaced with fresh media containing 10% FBS. At confluence, cells were passaged once at 25,000 cells/cm² and grown for 5 days before assays. We previously showed that cells obtained under these culture conditions show an osteoblast-like cell phenotype (35,37,38).

Determination of PGE₂ and leukotrienes

OA subchondral Ob were grown in T25 flasks and conditioned media were obtained from the last 2 days of culture in HAMF12/DMEM (Sigma) media containing 0.5% FBS in the presence of 10 nM ionomycin for the last 4 hours of culture to promote LTB₄ synthesis. Cells were incubated with or without 10 µM NS-398 (Sigma, inhibitor of PGE₂ synthesis), 10 µM BayX-1005 (inhibitor of FLAP, Merckle GmbH, Ulm, Germany) or with licofelone (Merckle GmbH; 0.8, 2.6 or 8 µM). Supernatants were recuperated for the determination of both PGE₂ and LTB₄ while the cells were solubilized and prepared for protein determination by the bicinchoninic acid method (39). The levels of PGE₂ and of leukotriene LTB₄ were determined using specific EIA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Phenotypic characterization of osteoblasts: osteocalcin and alkaline phosphatase

For the determination of biomarkers, cells were treated with 50 ng/ml of 1,25(OH)₂D₃ (generous gift of Dr. Uskokovic, Hoffman-LaRoche, Nutley, NJ), and were incubated in the absence or presence of therapeutic concentrations of licofelone (0.8 - 8 µM), NS-398 (10 µM) or BayX-1005 (10 µM). Media were collected at the end of the incubation and frozen at -80°C prior to assays. Cells were then washed twice with

phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 and solubilized in alkaline phosphatase buffer consisting of 100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 1% Triton X-100, pH 10.5. Nascent osteocalcin was determined by a specific EIA (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA) and alkaline phosphatase (ALPase) activity was determined as the release of p-nitrophenol hydrolyzed from p-nitrophenyl phosphate as previously described (35,37,38). In another series of experiments, the effect of LTB₄ on osteocalcin secretion and ALPase by both normal and OA Ob was performed. LTB₄ at doses ranging from 10⁻¹⁴ to 10⁻⁹ M was applied to confluent cells for their last 48 hours of culture in HAMF12/DMEM media containing 0.5% FBS, and with 10 nM ionomycin (Sigma-Aldrich) for the last 4 hours of culture.

Western blot analysis of leukotriene receptors BLT1 and BLT2

Two LTB₄ receptors were previously described, BLT1 and BLT2 (40,41), however their presence was never assessed in bone tissues. Hence, Ob were extracted in the RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin and pepstatin, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM NaF) and the protein determined. Twenty µg of cellular proteins extract were separated on 10% SDS-polycrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membrane. After blocking with 5% skim milk in TTBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) pH 7.5, 0.1% Tween® 20 and washing, the membranes were sequentially incubated overnight at 4°C with the primary antibody (rabbit polyclonal anti-human BLT1 or BLT2; 1:10,000 dilution, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) and with horseradish peroxidase goat anti-rabbit (Pierce; 1:20,000 dilution), and visualized using an ECL-plus kit (Pierce)

according to the manufacturer's directions. BLT1 should give a band at 58-65 kDa with possibly a doublet whereas BLT2 a band at 47-52 kDa.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM of n independent experiments. Assays were performed in duplicate. Dose-response data was analyzed statistically using ANOVA analysis of variance. When ANOVA reached significance, subtests were performed using Fisher's protected t-test. In some cases, a Student t test was used as indicated in the text. A difference of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

We first tested the capacity of normal and OA subchondral osteoblasts to produce LTB₄. Data indicate that OA subchondral osteoblasts generally have more variable endogenous production of LTB₄ and PGE₂ than normal osteoblasts (Figure 1). Basal levels of LTB₄ from all OA subchondral osteoblasts averaged 61.3 ± 10.3 pg/mg protein (n=16), whereas LTB₄ levels in normal osteoblasts were 29.8 ± 2.8 pg/mg protein (n=5) ($p < 0.01$ by Student t-test). Interestingly, the distribution of LTB₄ and PGE₂ levels were variable from one OA patient to another yet varied in opposite directions (Figure 1). Hence, two groups of OA patients were observed: those whose Ob showed high PGE₂ levels (above 4000 pg/mg protein or 2 SD above mean value for normal Ob) and low LTB₄ levels, and those whose Ob showed low PGE₂ levels and the highest LTB₄ levels (Figure 1). Due to this inherent variability in LTB₄ levels between OA patients, data for the effect of licofelone on OA Ob are presented as the percentage compared to control (Figure 2A).

At clinically relevant concentrations, licofelone had a dose-dependent inhibitory effect on endogenous LTB₄ production by OA Ob ($p < 0.0001$ by ANOVA), reaching a maximum of $67.0 \pm 7.6\%$ at 8 μ M licofelone (Figure 2A). The inhibition by licofelone was variable according to initial endogenous LTB₄ levels in individual OA Ob and at maximal concentration of licofelone, LTB₄ values reached similar levels as that in normal Ob. Acute NS-398 (10 μ M) treatment (48 hours) failed to significantly modify LTB₄ values (Figure 2A) although they reduced PGE₂ levels (Figure 2B). However long term inhibition (5 days) with NS-398 increased LTB₄ values about 4 fold (Figure 2A) yet did not reduce PGE₂ levels more than following two days of treatment (not shown). BayX-1005 (10 μ M)

inhibited LTB₄ production by OA Ob ($38.7 \pm 14.5\%$, $p < 0.05$); however, its effect was not as strong as with licofelone (Figure 2A).

OA Ob also produced high levels of PGE₂ (3974.7 ± 459.6 pg/mg protein, $n=16$). This production of PGE₂ was also inhibited by clinically relevant concentrations of licofelone in OA subchondral osteoblasts ($p < 0.0001$ by ANOVA, Figure 2B), reaching an average of $61.2 \pm 6.4\%$ at $8 \mu\text{M}$ licofelone. Initial PGE₂ levels in OA Ob were also variable as for LTB₄ levels, but licofelone reduced PGE₂ to similar levels in all OA Ob. NS-398 ($10 \mu\text{M}$), which selectively inhibits COX-2 and therefore PGE₂ production, inhibited this production in OA subchondral Ob by $75.8 \pm 5.3\%$ ($p < 0.01$), whereas BayX-1005 ($10 \mu\text{M}$), a specific inhibitor of FLAP, hence of leukotriene production, only marginally inhibited PGE₂ production ($14.8 \pm 5.3\%$, $p < 0.05$).

Two markers of the osteoblast phenotype, namely alkaline phosphatase activity and osteocalcin release, were not similarly affected by licofelone. Indeed, the basal alkaline phosphatase activity was not significantly affected by increasing concentrations of licofelone up to $8 \mu\text{M}$ (not illustrated). Conversely, under $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulation, which increases alkaline phosphatase activity about 2 fold (35,38), licofelone dose-dependently stimulated this activity (Figure 3A, $p < 0.0009$ by ANOVA). NS-398 ($10 \mu\text{M}$), which inhibits PGE₂ production (Figure 2B), failed to influence $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -stimulated alkaline phosphatase activity, and BayX-1005 ($10 \mu\text{M}$) caused a slight but significant increase (Figure 3A, $p < 0.05$). In contrast to effects on alkaline phosphatase activity, osteocalcin secretion by OA subchondral Ob was dose-dependently inhibited by licofelone ($p < 0.015$ by ANOVA), and a maximal inhibition of $36.7 \pm 15.0\%$ was obtained at $8 \mu\text{M}$ licofelone (Figure 3B). NS-398 did not affect osteocalcin secretion, a situation similar to that of

alkaline phosphatase activity while BayX-1005 inhibited osteocalcin secretion by $28.2 \pm 5.2\%$ ($p < 0.05$). The effect of licofelone on osteocalcin secretion was not related to a regulation of the expression of osteocalcin as Northern blot analysis (N=4 OA cases) failed to show any significant effects of this drug on mRNA levels: Osteocalcin/GAPDH ratios of 1.05 ± 0.06 , 1.02 ± 0.06 , 0.97 ± 0.06 and 0.97 ± 0.06 for 0, 0.8, 2.6 and 8 μM licofelone respectively (not illustrated). Licofelone also did not affect cell proliferation nor cell protein levels in OA Ob (not illustrated).

As licofelone inhibits both LTB_4 and PGE_2 production in OA subchondral Ob yet only the inhibition of LTB_4 production seemed to modulate the expression of osteoblast biomarkers, we next evaluated whether the addition of exogenous LTB_4 could affect alkaline phosphatase activity and osteocalcin release in both normal and OA Ob. Increasing doses of LTB_4 (10^{-13} to 10^{-11} M) significantly inhibited $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced alkaline phosphatase activity in OA Ob (Figure 4A), whereas higher doses (10^{-10} M) almost reverted this activity to its initial control value. Data were similar for alkaline phosphatase activity in response to LTB_4 regardless of endogenous levels by these cells. In contrast, under similar conditions, exogenous LTB_4 had two opposing effects on osteocalcin release depending on initial endogenous LTB_4 production by these cells. Indeed, when OA Ob had higher initial basal LTB_4 levels, exogenous LTB_4 addition inhibited osteocalcin production, whereas when cells had lower basal levels, the addition of LTB_4 stimulated osteocalcin release (Figure 4B). LTB_4 addition (10^{-13} to 10^{-10} M) to normal Ob did not significantly modulate $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced alkaline phosphatase activity (Figure 5A). Interestingly, in normal Ob, LTB_4 dose-dependently stimulated osteocalcin release (Figure 5B, $p < 0.02$ by ANOVA).

To investigate by which pathway LTB₄ affects Ob, we evaluated the presence of leukotriene receptors BLT1 and BLT2 in normal and OA Ob by Western blot analysis. Using polyclonal antibodies against BLT1 receptors showed a strong response in both normal and OA Ob (Figure 6). Two major bands were observed at molecular weights of 53 and 58 kDa which correspond to BLT2 and BLT1 respectively, suggesting that there was a cross-reactivity between the two receptors and the antibodies used. Indeed, using polyclonal anti-BLT2 antibodies showed a similar pattern of expression (not illustrated). Of note, in one normal Ob cell culture, the 53 kDa band representing BLT2 was undetectable. However, densitometric analysis of the BLT1 58 kDa bands failed to show any significant differences between normal and OA Ob.

DISCUSSION

Increasing evidence suggests that the subchondral bone compartment is intimately linked with the initiation and/or progression of OA (6-8). We previously observed abnormal bone cell biomarkers, cytokine and prostaglandin levels in *in vitro* OA subchondral Ob compared to normal (28,35,36). The present data further indicate that *in vitro* OA Ob can also synthesize LTB₄. Two groups of OA Ob, one with PGE₂ levels similar to normal Ob and high LTB₄ levels and the other with higher than normal PGE₂ and low LTB₄ levels were observed, a situation we previously observed for the production of cytokines and PGE₂ (28). Licofelone inhibited the endogenous *in vitro* production of both LTB₄ and PGE₂ by OA Ob to similar levels. As PGE₂ levels were high and LTB₄ levels were low or vice versa, this could suggest that both pathways are actively involved in OA pathogenesis.

The synthesis of both LTB₄ and PGE₂ requires AA, and therefore it is plausible that one or the other pathway is used under conditions of high production of AA. Producing leukotrienes is potentially more harmful than PGE₂ for the inflammatory process since the former are potent chemotactic agents, and can increase microvascular permeability (42-44). As PGE₂ and LTB₄ levels varied in opposite directions in OA Ob, this raises the question whether long term inhibition of COX-2 in OA patients, possibly leading to a shunt to the 5-LO pathway, would be more detrimental to Ob and therefore, to joints in OA patients. Interestingly, we were able to demonstrate this shunt in OA osteoblasts following long term ("chronic") inhibition of COX-2 with NS-398. This shunt toward leukotrienes production has been previously shown in other tissues (16,17,31), but to our knowledge our study is

the first indication in osteoblasts. Therefore, a therapeutic intervention aimed at reducing both pathways may potentially be very attractive for the treatment of OA patients.

Licofelone reduced $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced osteocalcin secretion via its inhibition of LTB_4 production in OA Ob, not via the inhibition of PGE_2 synthesis since NS-398 treatments could not reproduce this effect while BayX-1005 could. This inhibition of osteocalcin secretion is post-transcriptional since licofelone failed to directly modify osteocalcin mRNA levels (not illustrated). In contrast, licofelone or BayX-1005 stimulated $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced alkaline phosphatase activity while exogenous LTB_4 addition inhibited alkaline phosphatase activity in OA Ob, and NS-398 was without effect. These results suggest that licofelone does not have any general inhibitory effect on $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -dependent pathways, and further suggest that its effects are mediated, at least in part, by leukotrienes. In contrast, LTB_4 had mixed effects on cell biomarkers in normal Ob, stimulating osteocalcin release while it failed to significantly alter alkaline phosphatase activity. This could indicate that LTB_4 more specifically targets the secretion of osteocalcin and has more limited effects on alkaline phosphatase activity under normal conditions. However, under abnormal conditions, such as in OA subchondral osteoblasts where alkaline phosphatase activity is already increased (35), it could have an effect as shown here. However, these limited differential effects of LTB_4 in normal and OA Ob could not be accounted for by abnormal levels or expression of LTB_4 receptors. Indeed we observed similar levels for BLT1 between normal and OA Ob, and variable levels for BLT2 receptors in normal compared to OA Ob. This is also peculiar as BLT2 receptors were believed to be ubiquitous (41) whereas BLT1 receptors are expressed almost

exclusively in peripheral leukocytes (40); however, bone tissues were not tested in these studies.

Osteocalcin levels have been shown to be elevated in bones of OA patients *in vivo* even at non-weight bearing sites (45), and in *in vitro* subchondral OA osteoblasts (35). As osteocalcin may retard normal mineralization *in vivo*, its high levels in OA individuals could explain the abnormally low bone mineralization in these patients. Indeed, it was first believed that OA bones were hypermineralized using mineral density quantification by backscattered electric image analysis (46) and a density fractionation technique (47). However, the acceleration of bone turnover in OA results in hypomineralized subchondral bone and reduces its stiffness for a given apparent density but increases stiffness if this is offset by increased bone volume (48). The stiffness of trabecular bone is increased in OA because more trabeculae are present (49); however, material stiffness measured by an ultrasonic method not considering the contribution of increased subchondral bone thickness revealed OA bone were less stiff (50). Lastly, Mansell and Bailey recently showed that subchondral trabecular OA bone explants from the femoral head were hypomineralized since molar calcium to collagen ratios were reduced in OA compared to normal bone explants (51), whereas bone analyzed far away from the joint, such as the iliac crest, is hypermineralized in OA (52). Lastly, urinary parameters of bone turnover are slightly lower in spinal osteoarthritis compared to normal (53), while these are increased in both RA and OA patients (54), suggesting that generalized OA is more likely linked to an increase in bone turnover. Hence, reducing osteocalcin release from OA osteoblasts may promote a better mineralization in these individuals.

Recent studies in our laboratory have shown that NSAIDs that affect subchondral Ob prevented cartilage lesions in an OA dog model whereas those that did not affect Ob also did not significantly prevent cartilage lesions in this model (55). It is therefore possible that some NSAIDs may be promoting a protective effect via yet other pathways than simply reducing PGE₂ production. Therefore, a compound with inhibitory activity against both COX-1 and -2, and 5-LO may be very attractive for the treatment of OA since it would combine efficiency, gastric protection, and possibly impact an important mechanism involved in the onset and/or progression of OA. Moreover, prolonged therapy in OA individuals with different NSAIDs that contribute to a reduction in prostaglandin production may not necessarily protect from an increase in leukotrienes. Indeed, the possible shunt from the COX to the 5-LO pathway after prolonged inhibition of COX activity and/or a negative retro-feedback of PGE₂ on COX could contribute significantly to the inflammatory process observed in these individuals.

In conclusion, OA subchondral osteoblasts possess a functional 5-lipoxygenase activity that can synthesize LTB₄. Licoferone specifically inhibits LTB₄ and PGE₂ synthesis, inhibits osteocalcin synthesis and promotes alkaline phosphatase activity via its effect on LTB₄ synthesis, not PGE₂ synthesis. Since, licoferone modifies selective pathways in osteoblasts that contribute to alter bone remodeling in OA patients, this therapeutic intervention could protect from progression of OA.

ACKNOWLEDGMENT

Dr. Daniel Lajeunesse is a senior scholar funded by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We wish to thank Aline Delalandre for expert technical assistance. We also want to thank Sophie Langevin, Colleen Byrne and Santa Fiori for assistance in manuscript preparation.

REFERENCES

1. Centers for Disease Control. Arthritis prevalence and activity limitations--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:433-8.
2. Dieppe P. Osteoarthritis: Clinical and research perspective. *Br J Rheumatol* 1991;30 (Suppl 1):1-4.
3. Davis MA. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 1988;4:241-55.
4. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 1969-84.
5. Hough AJ. Pathology of osteoarthritis. Koopman WJ, editor. *Arthritis and allied conditions*. 13th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p. 1945-68.
6. Dequeker J, Luyten F.P. Bone mass and osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:S21-6.
7. Burr DB, Schaffler MB. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech* 1997;37:343-57.
8. Bailey AJ, Mansell JP. Do subchondral bone changes exacerbate or precede articular cartilage destruction in osteoarthritis of the elderly? *Gerontology* 1997;43:296-304.
9. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271:33157-60.

10. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995;36-46.
11. Radmark OP. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S11-5.
12. Silverman ES, Drazen JM. The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111:525-36.
13. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231:232-5.
14. Simon LS. Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol* 1996;8:169-75.
15. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1999;340:1888-99.
16. Dyer RD, Connor DT. Dual inhibitors of prostaglandin and leukotriene biosynthesis. *Current Pharmaceutical Design* 1997;3:463-72.
17. Rainsford KD. Leukotrienes in the pathogenesis of NSAID-induced gastric and intestinal mucosal damage. *Agents Actions* 1993;39 Spec No:C24-6.
18. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993;8 Suppl 2:S505-10.
19. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest* 1999;79:83-94.

20. Raisz LG. Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:419-21.
21. Tai H, Miyaura C, Pilbeam CC, Tamura T, Ohsugi Y, Koishihara Y, et al. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation. *Endocrinology* 1997;138:2372-9.
22. Hurley MM, Lee SK, Raisz LG, Bernecker P, Lorenzo J. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures. *Bone* 1998;22:309-16.
23. Lader CS, Flanagan AM. Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 1998;139:3157-64.
24. Woodiel FN, Fall PM, Raisz LG. Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: structure-activity relations and signal transduction pathway. *J Bone Miner Res* 1996;11:1249-55.
25. Fall PM, Breault DT, Raisz LG. Inhibition of collagen synthesis by prostaglandins in the immortalized rat osteoblastic cell line Py1a: structure-activity relations and signal transduction mechanisms. *J Bone Miner Res* 1994;9:1935-43.
26. Chow JW, Chambers TJ. Indomethacin has distinct early and late actions on bone formation induced by mechanical stimulation. *Am J Physiol* 1994;267:E287-92.
27. Wittenberg RH, Willburger RE, Kleemeyer KS, Peskar BA. *In vitro* release of

- prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. *Arthritis Rheum* 1993;36:1444-50.
28. Benderdour M, Hilal G, Lajeunesse D, Pelletier JP, Duval N, Martel-Pelletier J. Osteoarthritic osteoblasts show variable levels of cytokines production despite similar phenotypic expression. *Arthritis Rheum* 1999;42:S251 (Abstract).
 29. Laufer S, Tries S, Augustin J, Dannhardt G. Pharmacological profile of a new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneimittelforschung* 1994;44:629-36.
 30. Laufer SA, Augustin J, Dannhardt G, Kiefer W. (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Med Chem* 1994;37:1894-7.
 31. Laufer S. Discovery and Development of ML 3000. *Inflammopharmacology* 2001;(In Press).
 32. Gay RE, Neidhart M, Pataky F, Tries S, Laufer S, Gay S. Dual inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenases 1 and 2 by ML3000 reduces joint destruction in adjuvant arthritis. *J Rheumatol* 2001;28:2060-5.
 33. Celotti F, Laufer S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res* 2001;43:429-36.
 34. Altman RD, Asch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis.

- Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-49.
35. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype *in vitro*: Possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* 1998;41:891-9.
 36. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Lajeunesse D. Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum* 1999;42:2112-22.
 37. Lajeunesse D, Busque L, Ménard P, Brunette MG, Bonny Y. Demonstration of an osteoblast defect in two cases of human malignant osteopetrosis: Correction of the phenotype after bone marrow transplant. *J Clin Invest* 1996;98:1835-42.
 38. Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone & Mineral* 1991;14:237-50.
 39. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
 40. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 1997;387:620-4.
 41. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T. A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* 2000;192:421-32.

42. Penrose JF, Austen KF. The biochemical, molecular, and genomic aspects of leukotriene C4 synthase. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111:537-46.
43. Los M, Schenk H, Hexel K, Baeuerle PA, Droge W, Schulze-Osthoff K. IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J* 1995;14:3731-40.
44. Gok S, Ulker S, Huseyinov A, Hatip FB, Cinar MG, Evinc A. Role of leukotrienes on coronary vasoconstriction in isolated hearts of arthritic rats: effect of in vivo treatment with CI-986, a dual inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase. *Pharmacology* 2000;60:41-6.
45. Gevers G, Dequeker J. Collagen and non-collagenous protein content (osteocalcin, sialoprotein, proteoglycan) in the iliac crest bone and serum osteocalcin in women with and without hand osteoarthritis. *Coll Relat Res* 1987;7:435-42.
46. Boyde A, Jones SJ, Aerssens J, Dequeker J. Mineral density quantitation of the human cortical iliac crest by backscattered electron image analysis: variations with age, sex, and degree of osteoarthritis. *Bone* 1995;16:619-27.
47. Raymaekers G, Aerssens J, Van den Eynde R, Peeters J, Geusens P, Devos P, et al. Alterations of the mineralization profile and osteocalcin concentrations in osteoarthritic cortical iliac crest bone. *Calcif Tissue Int* 1992;51:269-75.
48. Burr DB. The importance of subchondral bone in osteoarthrosis. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:256-562.

49. Li B, Aspden RM. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:247-54.
50. Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res* 1997;12:641-51.
51. Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998;101:1596-603.
52. Gevers G, Dequeker J, Martens M, Van Audekercke R, Nyssen-Behets C, Dhem A. Biomechanical characteristics of iliac crest bone in elderly women according to osteoarthritis grade at the hand joints. *J Rheumatol* 1989;16:660-663.
53. Peel NF, Barrington NA, Blumsohn A, Colwell A, Hannon R, Eastell R. Bone mineral density and bone turnover in spinal osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:867-871.
54. Seibel MJ, Duncan A, Robins SP. Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases. *J Rheumatol* 1989;16:964-970.
55. Pelletier JP, Lajeunesse D, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Jolicoeur FC, Hilal G, et al. Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000;27:2893-902.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Relationship between the levels of LTB₄ and PGE₂ by human OA and normal subchondral osteoblasts. Human OA and normal osteoblasts were cultured to confluence in HAMF12/DMEM media containing 10% fetal bovine serum (FBS). They were then fed HAMF12/DMEM with 0.5% FBS for their last two days of culture. Supernatants were recuperated, and LTB₄ and PGE₂ measured using selective ELISA. Data points represent each individuals, and mean values \pm SD for normal, low and high OA individuals are indicated. Normal individuals, n=5; OA patients, n=16.

Figure 2: Effect of licofelone on **A:** LTB₄ and, **B:** PGE₂ production by human OA subchondral osteoblasts. Human OA osteoblasts were cultured to confluence in HAMF12/DMEM media containing 10% FBS. They were then fed HAMF12/DMEM with 0.5% FBS for their last two days of culture in the presence or not of increasing therapeutic doses of licofelone (0.8 to 8 μ M), or 10 μ M NS-398 or 10 μ M BayX-1005. Chronic treatment with NS-398 (NS-398 Ch) were also performed for 5 days in culture prior to the determination of LTB₄ (**A**) and PGE₂ (not illustrated). At the end of the incubation, LTB₄ and PGE₂ were measured in the supernatants. Results are expressed as % of control without licofelone, and are the mean \pm SEM of 10 patients for LTB₄ and 16 patients for PGE₂. $p < 0.0001$ by ANOVA for the different treatments for both LTB₄ and PGE₂. Statistical differences between individual treatments were obtained by Fisher's protected t-test following ANOVA, and are indicated directly on the Figure.

Figure 3: Effect of licofelone on **A:** alkaline phosphatase activity, and **B:** osteocalcin secretion of OA subchondral osteoblasts (n=5). Human OA osteoblasts were cultured to

confluence in HAMF12/DMEM media containing 10% FBS. Cells were then treated with HAMF12/DMEM media containing 2% charcoal-treated FBS, in the presence or absence of 50 nM 1,25(OH)₂D₃, and in the presence of increasing therapeutic doses of licofelone (0.8 to 8 μM), or NS-398 (10 μM) or BayX-1005 (10 μM). At the end of the incubation, cells were used for the determination of alkaline phosphatase activity and supernatants were collected for osteocalcin determination. Results are the mean ± SEM. $p < 0.0009$ and $p < 0.015$ by ANOVA for alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion respectively. Specific subtests were performed by Fisher's protected t-test following ANOVA.

Figure 4: Effect of exogenous addition of LTB₄ on **A:** alkaline phosphatase activity, and **B:** osteocalcin secretion by OA subchondral osteoblasts. Confluent cells were treated as in Figure 3 except they were treated with increasing concentrations (10^{-13} to 10^{-10} M) of LTB₄ for the last two days of culture in the presence of 50 nM 1,25(OH)₂D₃. Values are reported as % of control and are the mean ± SEM of 9 patients for alkaline phosphatase, and 7 patients for osteocalcin, 4 with low endogenous LTB₄ levels (OA low) and 3 with high endogenous LTB₄ levels (OA high) as determined in Figure 1.

Figure 5: Effect of exogenous addition of LTB₄ on **A:** alkaline phosphatase activity, and **B:** osteocalcin secretion by normal human subchondral osteoblasts. Confluent cells were treated as OA osteoblasts, as described in Figure 3, except they were treated with increasing concentrations (10^{-13} to 10^{-10} M) of LTB₄ for the last two days of culture in the presence of 50 nM 1,25(OH)₂D₃. Values are reported as % of control and are the mean ± SEM of 5 patients for alkaline phosphatase activity and 3 patients for osteocalcin secretion. $p < 0.02$ by ANOVA for osteocalcin. Specific subtests were performed by Fisher's protected t-test following ANOVA for LTB₄ dose-response and are indicated directly on the Figure.

Figure 6: Western blot analysis of leukotriene receptors BLT1 in normal and OA osteoblasts. Confluent cells were lysed and separated by SDS-Page electrophoresis. Western blot analysis of BLT1 levels was performed using a polyclonal antibody and peroxidase labeled second antibody. Data show the results for 3 normal and 3 Ob.

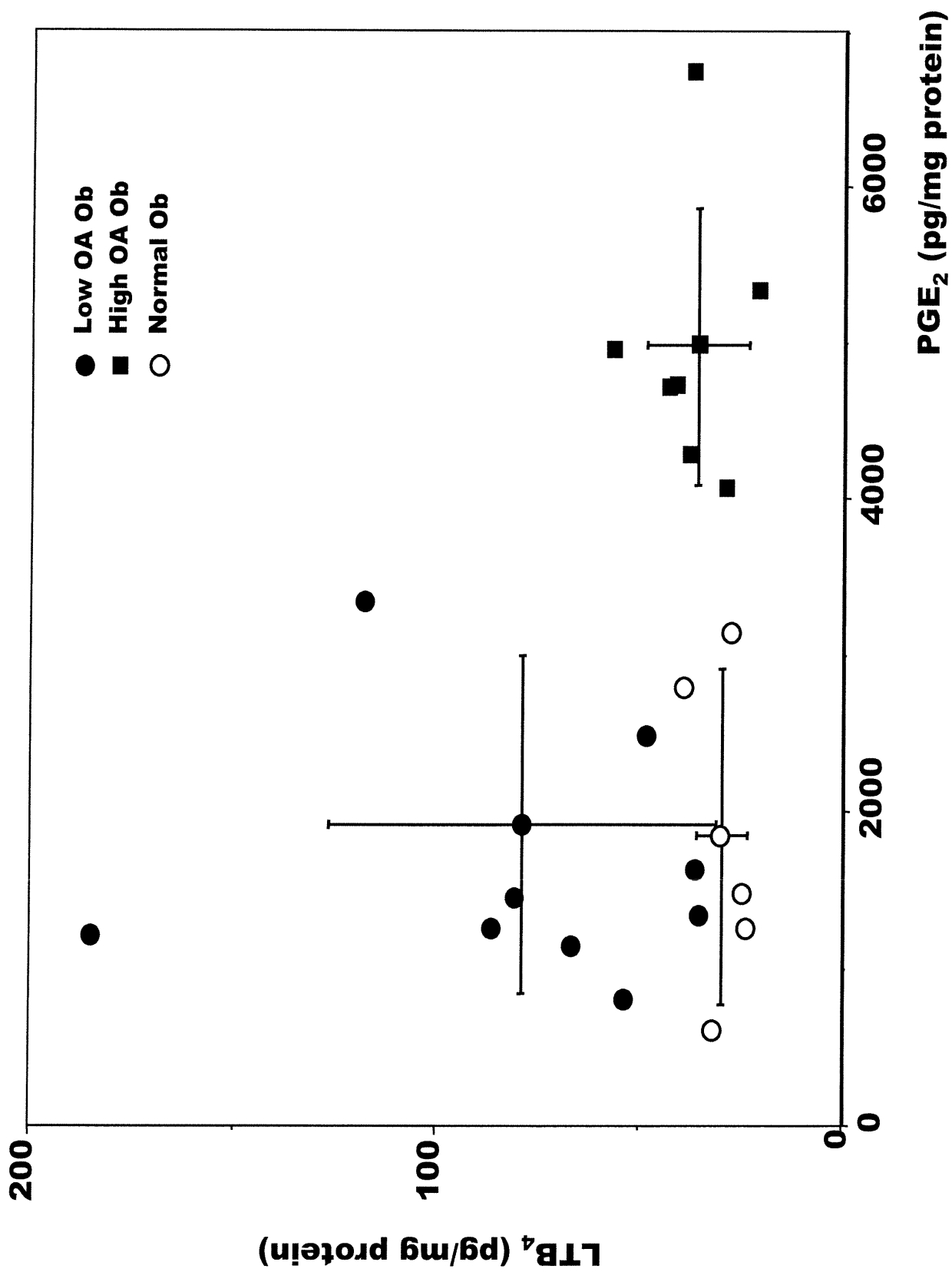


Figure 1: Paredes et al.

Figure 2A: Paredes et al.

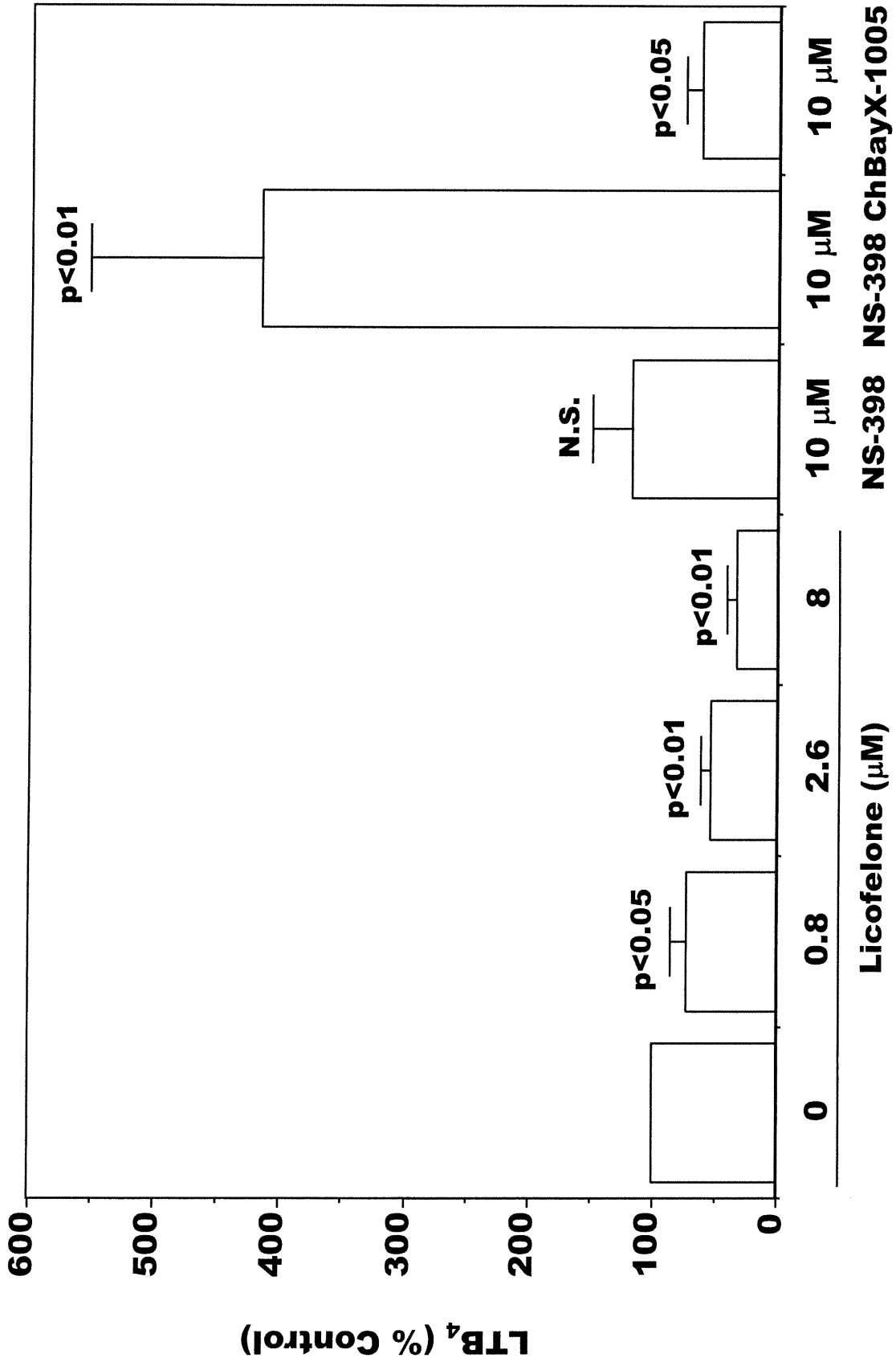


Figure 2B: Paredes et al.

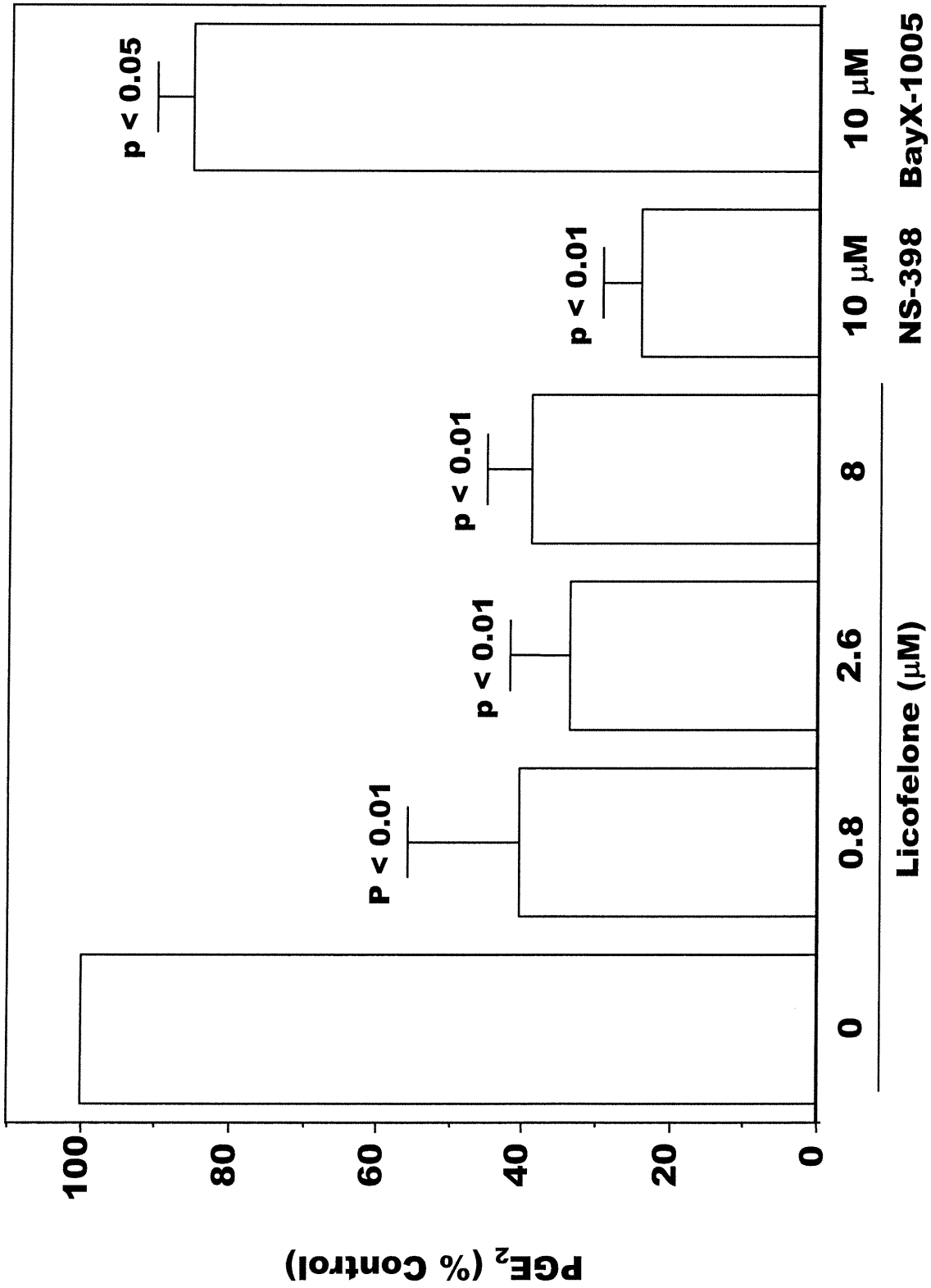


Figure 3A: Paredes et al.

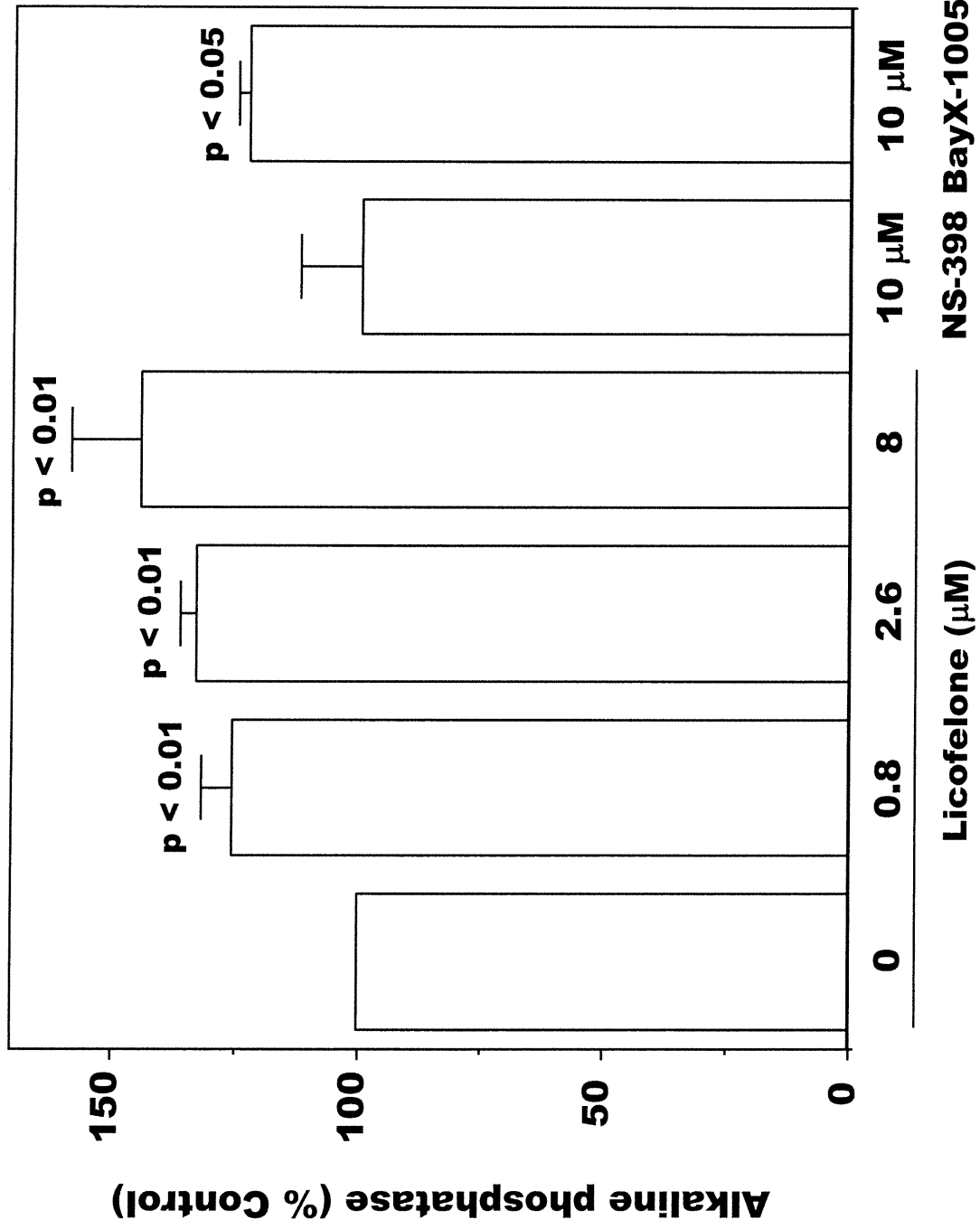


Figure 3B: Paredes et al.

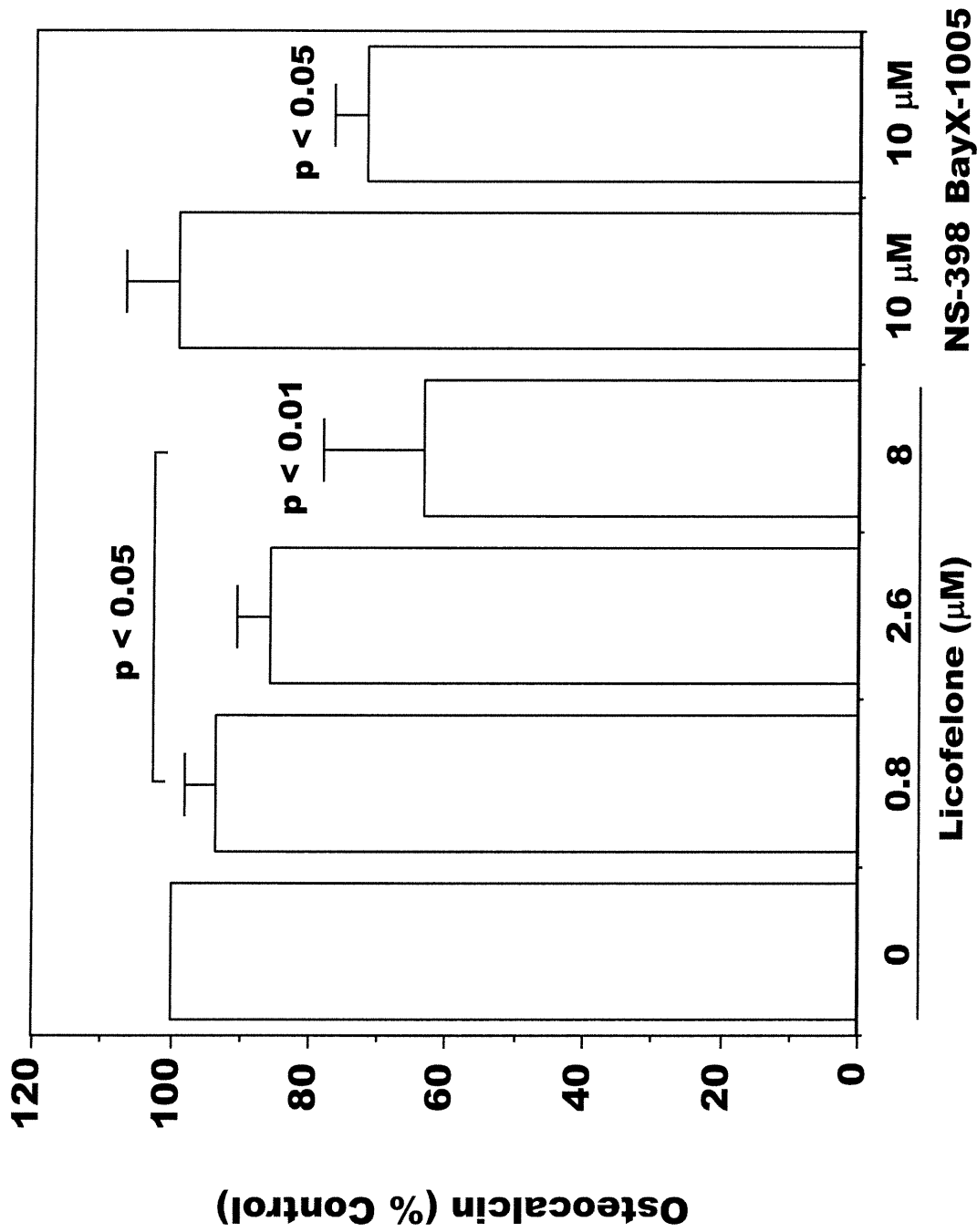
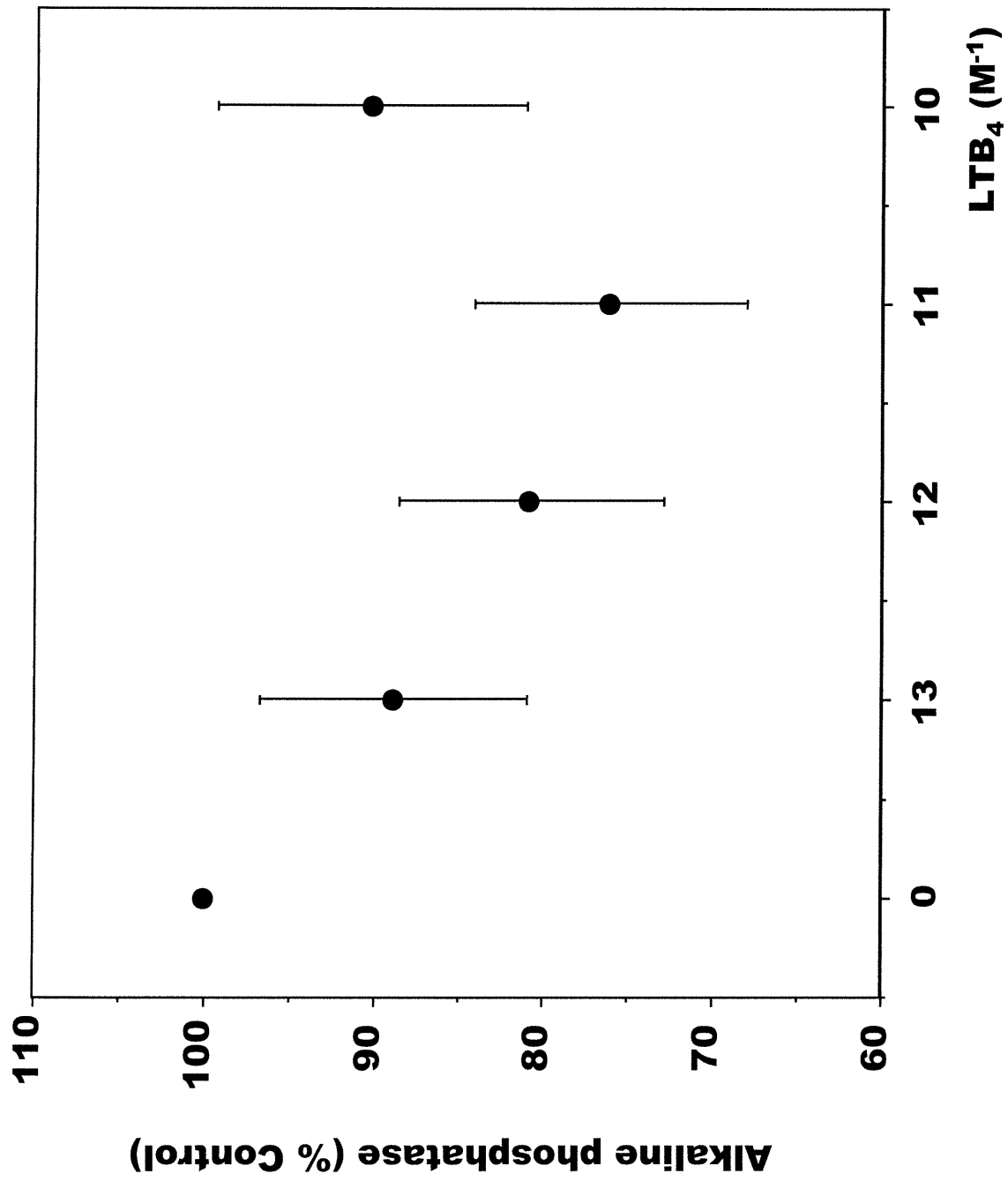


Figure 4A: Paredes et al.



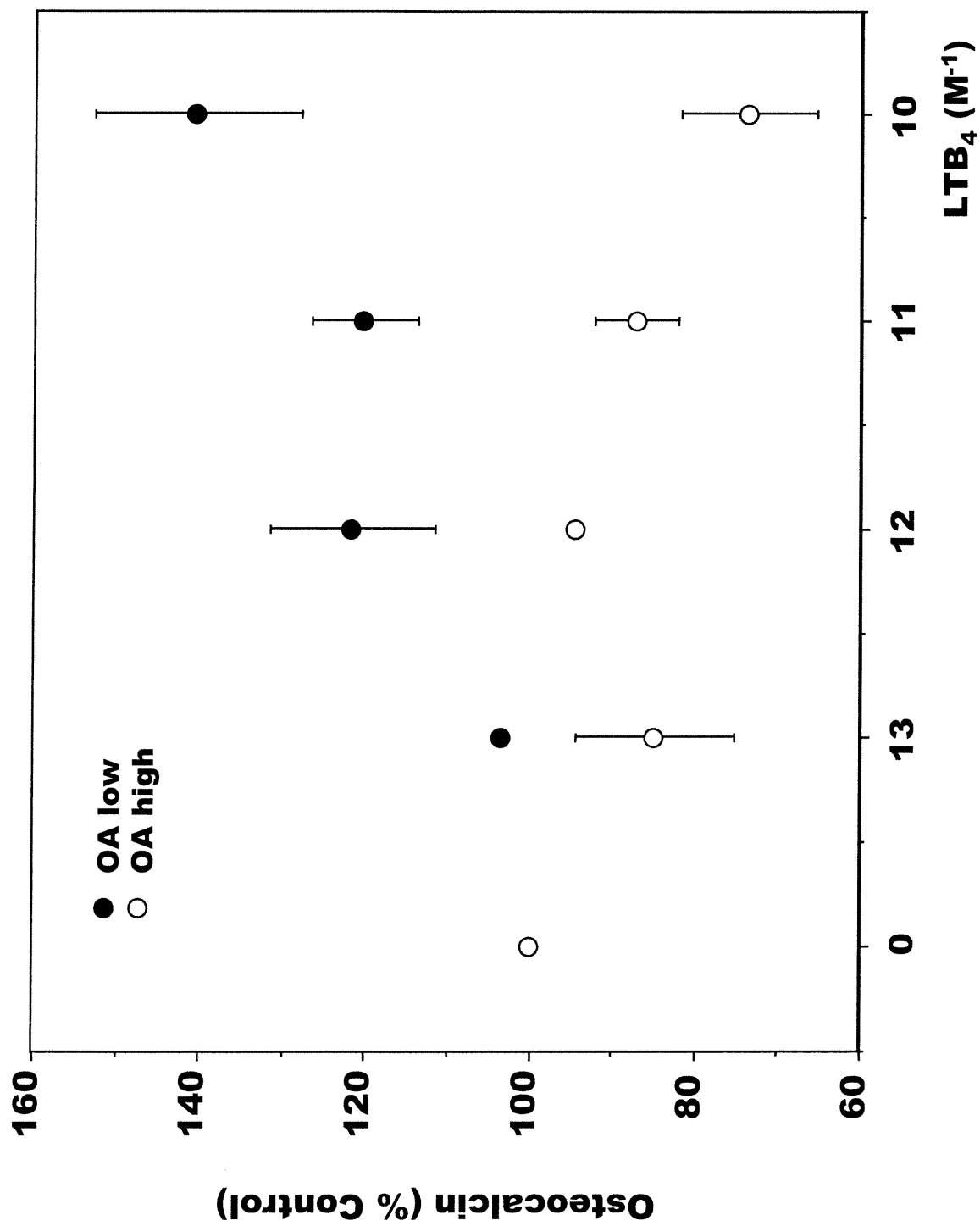


Figure 4B: Paredes et al.

Figure 5A: Paredes et al.

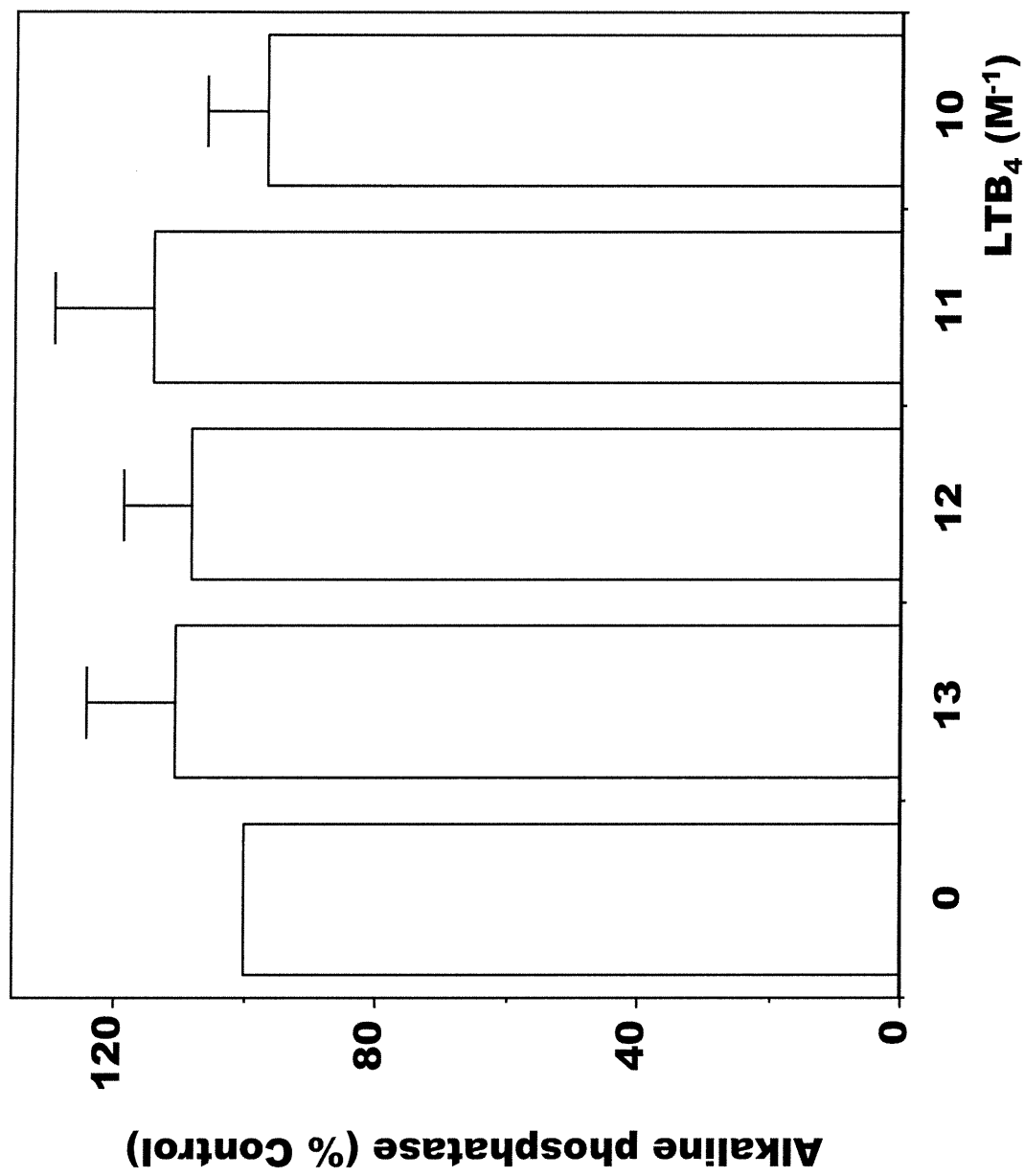


Figure 5B: Paredes et al.

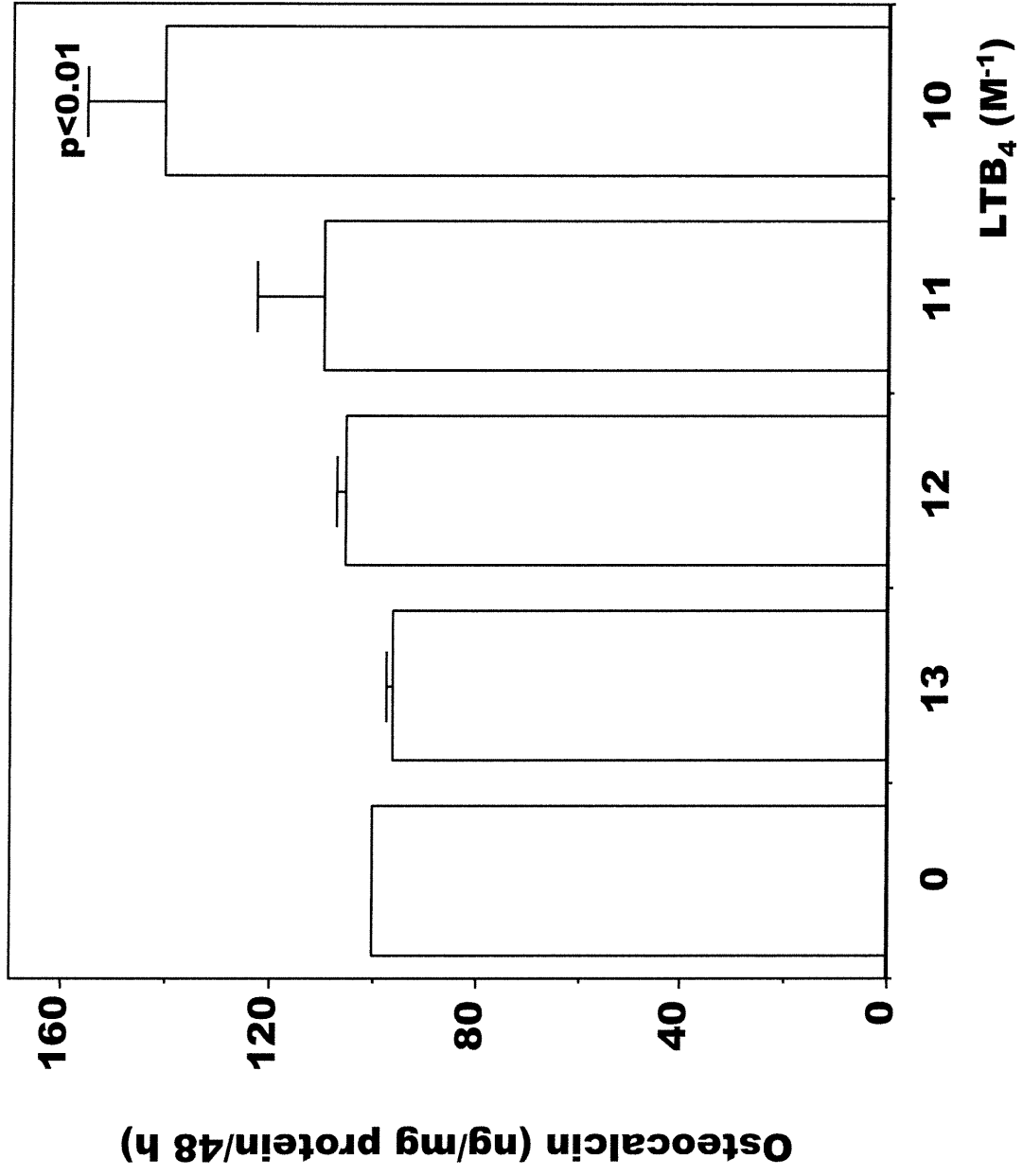
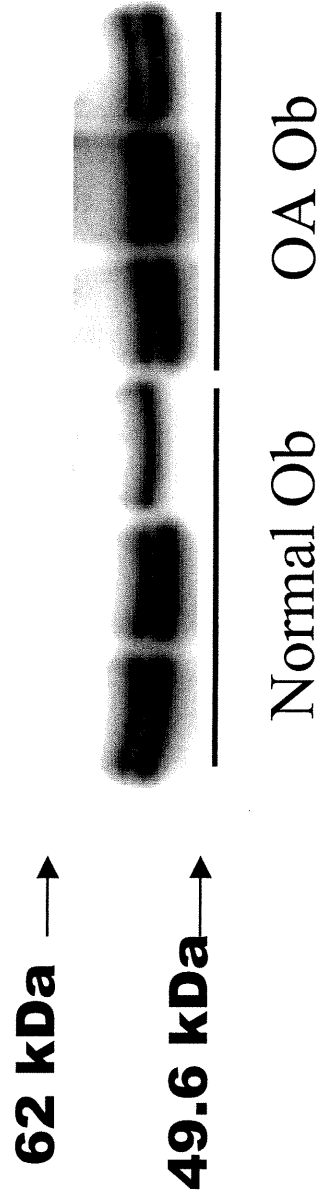


Figure 6: Paredes et al.



C: RÉSULTATS SUPPLEMENTAIRES

RT-PCR de la 5-LO

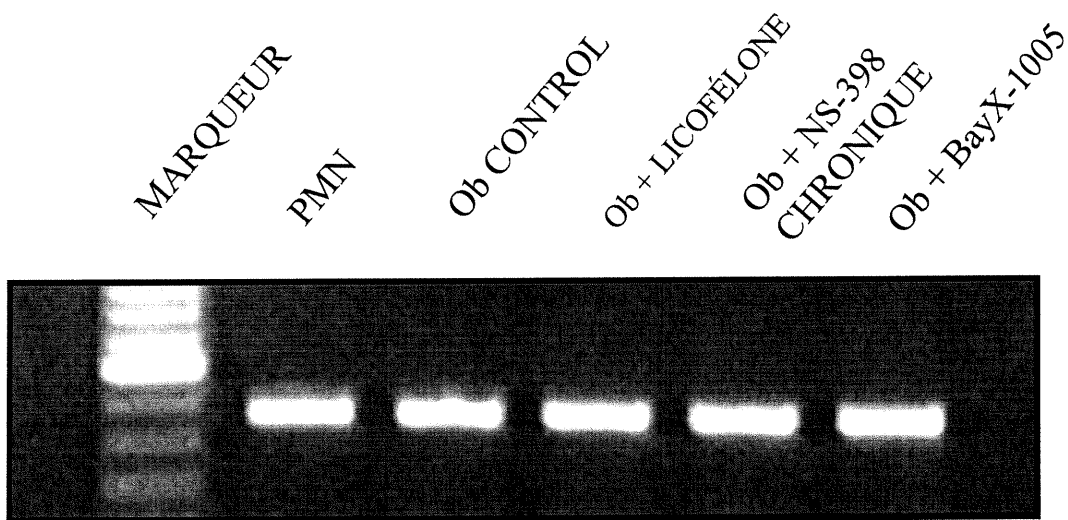


Figure R.S.1: Le RT-PCR de la 5-LO qui démontre l'effet produit du licofénone, du NS-398 chronique, et du BAY-X sur l'enzyme 5-LO.

RT-PCR de FLAP

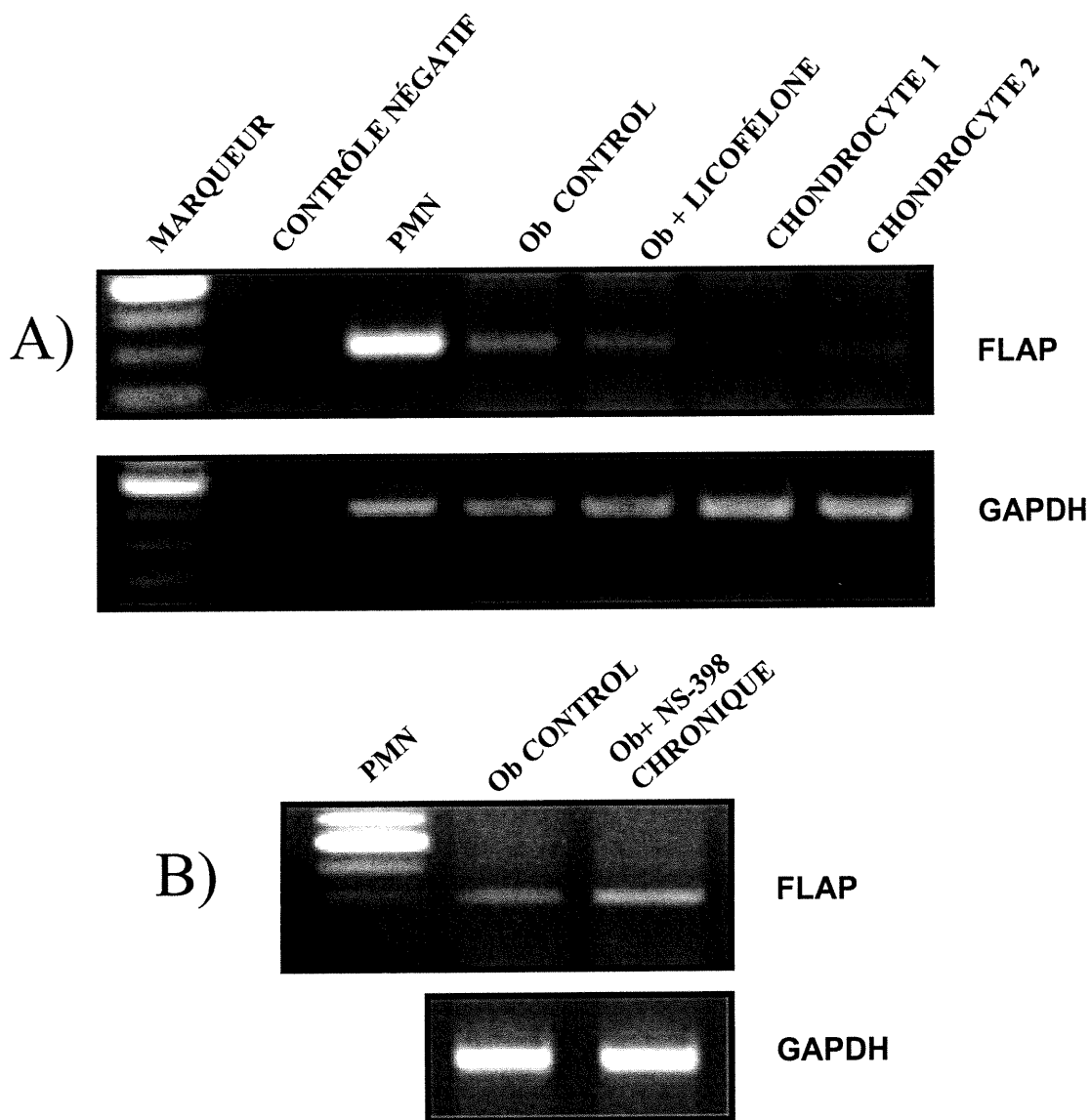


Figure R.S.2: A) Le RT-PCR de l'enzyme FLAP. On peut comparer dans cette figure le niveau de FLAP entre le PMN, un contrôle et les ostéoblastes traités avec le licofélone. En plus, on peut comparer le niveau de la FLAP entre les ostéoblastes et les chondrocytes. **B)** Un autre résultat d'un RT-PCR de la FLAP mais cette fois-ci les cellules ont été traitées avec le NS-398 de façon chronique. Comme contrôle de ces RT-PCR s nous avons utilisé le gène ancillaire GAPDH.

D: DISCUSSION

La majorité des résultats de recherche sur l'arthrose ont été principalement obtenus sur le cartilage. En effet, les chercheurs exploraient plus les mécanismes cellulaires et moléculaires de ce tissu croyant que c'était le point d'origine de l'arthrose. La sclérose de l'os sous-chondral était donc considérée comme une conséquence secondaire de la dégradation du cartilage, mais lorsque certains chercheurs ont obtenu des résultats assez intéressants sur l'os sous-chondral arthrosique, l'exclusivité des recherches faites sur le cartilage fût remise en doute. Depuis les années 90 les travaux sur le métabolisme osseux de l'os arthrosique ont beaucoup avancé.

Notre laboratoire est un des premiers à analyser la physiologie cellulaire des ostéoblastes de l'os sous-chondral arthrosique *in vitro* et à examiner si ce tissu joue un rôle dans l'initiation et/ou la progression de l'arthrose. Notre Hypothèse de travail est basée sur les observations effectuées chez des modèles animaux où l'arthrose est spontanée (Carlson, Loeser et al., 1996) ou induite (Ewald, Poss et al., 1982), et qui démontrent un rôle primordial du tissu osseux dans cette pathologie. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette relation os-cartilage sont toujours méconnus (Pelletier, 2001). Les recherches effectuées par notre laboratoire démontrent qu'un défaut cellulaire des ostéoblastes serait la cause de la sclérose osseuse, et ceci pourrait contribuer à la dégradation du cartilage chez les patients arthrosiques, particulièrement si des facteurs locaux produits par les ostéoblastes

arthrosiques peuvent influencer le cartilage tel que proposé par Westacott et al. (Westacott, Webb et al., 1997). Premièrement, il a été démontré que l'activité de la phosphatase alcaline et la sécrétion de l'ostéocalcine étaient anormales dans les cellules OA. Étant donné que l'ostéocalcine joue un rôle important lors de la minéralisation, la qualité de l'os produit par ces cellules serait anormal chez les patients atteints de cette maladie. De plus, les résultats des travaux antérieurs de notre laboratoire ont démontré une anomalie de deux systèmes importants du remodelage osseux : le système uPA/plasmine et le système IGF/IGFBPs. Ainsi, ces anomalies pourraient contribuer à la sclérose osseuse et démontrer l'importance du tissu osseux dans l'arthrose. Donc, l'implication de ces défauts dans l'initiation et/ou la progression de l'arthrose reste encore à être démontrée, mais nos travaux ainsi que ceux des autres équipes suggèrent fortement que les modifications de l'os sous-chondral précèdent ceux du cartilage. De cette façon, si on croit que l'arthrose est initiée par un désordre osseux, les stratégies pour la soigner doivent cibler principalement les cellules osseuses. C'est pourquoi notre recherche sur la licofélone a été effectuée avec des ostéoblastes pour déterminer si cet AINS pouvait affecter certains mécanismes cellulaires, et influencer ainsi le métabolisme osseux.

Les ostéoblastes utilisés dans cette recherche provenaient de l'os sous-chondral du plateau tibial médial de patients arthrosiques qui subissaient un remplacement du genou, ainsi que d'individus normaux provenant d'autopsies. L'os sous-chondral des patients arthrosiques est différentiable de l'os normal

par son épaisseur. En effet, l'os arthrosique est plus épais que l'os normal, mais de manière surprenante il est aussi plus friable. Ces différences visuelles et mécaniques de l'os, ainsi que l'analyse des biomarqueurs des cellules, nous ont permis de confirmer que les ostéoblastes OA sont différents des normaux.

LES AINS ET LEURS EFFETS :

Les ostéoblastes ont été traités avec le nouvel inhibiteur double, la licofélone. La licofélone est reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires, antipyrétique, analgésique et son absence d'effets secondaires. Comparativement aux AINS classiques tel que le piroxicam, l'indométacine et le sulindac, la licofélone présente le moins d'effets secondaires. En effet les AINS classiques ont été utilisés dans le but principal de soulager les symptômes des maladies arthrosiques, et diminuer la douleur et l'inflammation. Cependant, leur utilisation à long terme peut conduire à des problèmes d'hypertension, de troubles cardiaques, mais surtout des problèmes intestinaux allant de simples troubles gastriques jusqu'au saignement et à la perforation. Le mécanisme d'action de cette classe de médicament est attribué à l'inhibition des COXs, ce qui produit conséquemment une inhibition de la conversion de l'acide arachidonique en PGs (Vane, 1971). Les prostaglandines, en plus d'être d'importants effecteurs des réactions inflammatoires, exercent des fonctions physiologiques spécifiques dans plusieurs organes, et de fait l'inhibition de la synthèse de ceux-ci produit des effets secondaires comme mentionné plus haut dans le rein, sur la pression artérielle et le système gastro-intestinal. Croyant

que ces effets secondaires sont dus à l'inhibition de COX-1 (l'enzyme exprimée constitutivement) les compagnies pharmaceutiques se sont tournées vers la production d'un inhibiteur sélectif pour la COX-2.

D'un certain point de vu, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 avaient un profil plus favorable pour la sécurité des patients en comparaison avec les AINS classiques, car les lésions gastriques étaient moindres. Par contre, de nouvelles informations sur la COX-2 ont démontré qu'elle n'était pas seulement impliquée dans l'inflammation. En effet, la COX-2 est aussi présente dans l'estomac (Lipsky, Brooks et al., 2000), est impliquée dans les maladies inflammatoires intestinales, et est surexprimée lors d'une infection bactérienne de la muqueuse gastrique (Mclaughlan, 1996). Ainsi des inhibiteurs spécifiques de COX-2 pourraient devenir nuisibles en présence d'une inflammation gastro-intestinale. Plusieurs études récentes ont évalué les effets des nouveaux inhibiteurs sélectifs pour COX-2 chez des animaux avec des inflammations gastro-intestinales préexistantes. Chez le rat, la majorité des prostaglandines produites par la muqueuse du colon dérivent de COX-2. Des traitements quotidiens avec un inhibiteur sélectif de COX-2 résultent en une inhibition significative de la synthèse de prostaglandines de la muqueuse et augmentent la sévérité du dommage au colon (Reuter, Asfaha et al., 1996). Donc, l'enzyme COX-2 ne serait pas seulement exprimée dans les tissus enflammés mais serait présent constitutivement dans plusieurs organes où il y aurait une synergie avec la COX-1 pour maintenir l'homéostasie tissulaire (Morham,

Langenbach et al., 1995). Ces résultats ainsi que d'autres nous permettent de proposer que l'utilisation des AINS sélectifs de COX-2 à long-terme n'est peut-être pas si favorable pour l'organisme puisque la COX-2 joue un rôle important dans différents organes.

L'EFFET DU LICOFÉLONE SUR LE PGE₂:

Nos résultats dans les ostéoblastes lors des traitements avec la licofélone démontrent qu'il produit une inhibition de la synthèse des prostaglandines, spécifiquement de PGE₂, de 61.2%. Si on le compare aux autres inhibiteurs comme l'indométacine, le piroxicam ou le paracétamol, le pourcentage d'inhibition de PGE₂ par la licofélone n'est pas très élevé, ce qui d'une part ne causerait pas une diminution dramatique des niveaux de prostaglandines dans la cellule et d'autre part l'inhibition n'étant pas aussi sélective permettrait de garder un niveau d'activité acceptable de COX-2. La licofélone peut donc influencer la formation osseuse, puisque le PGE₂ a un effet biphasique dans les ostéoblastes. Un niveau faible de PGE₂ est nécessaire pour le tissu, puisqu'une basse concentration de PGE₂ peut favoriser la formation osseuse. Premièrement, le PGE₂ a un effet double dans la synthèse du collagène (Raisz et Fall, 1990). À une concentration basse ou en présence de glucocorticoïdes, le PGE₂ augmente la synthèse de collagène. Par contre, à une concentration élevée ou en présence d'IGF-1, il inhibe la synthèse du collagène. Les prostaglandines ont aussi un effet anabolique dans la différenciation et la réplication des ostéoblastes et de plus elles accélèrent la

minéralisation (Gronowicz, Fall et al., 1994). Des expériences faites par Takiguchi et al ont démontré qu'à basse concentration de PGE₂ l'action de BMP-2 (bone morphogenetic protein-2), qui stimule la différenciation ostéoblastique, est aussi stimulée et ceci produit une augmentation de la différenciation cellulaire ostéoblastique (Takiguchi, Kobayashi et al., 1999). D'autre part, en ce qui a trait à la minéralisation, une basse concentration de PGE₂ augmente la minéralisation et la phosphatase alcaline (Kajii, Suzuki et al., 1999). Il existe moins d'évidences en ce qui a trait à l'effet anabolique des prostaglandines endogènes; cependant l'inhibition par les AINS de la déminéralisation dans des implantations osseuses chez le rat ou l'ossification hétérotypique qui se produit après le remplacement de l'articulation de la hanche chez l'humain (Kjaersgaard, Nafei et al., 1993) démontrent que les prostaglandines jouent un rôle dans la nouvelle formation osseuse. D'autre part, le PGE₂ est aussi impliqué dans la résorption osseuse, car des concentrations élevées de PGE₂ peuvent activer la formation d'ostéoclastes (Shinar et Rodan, 1990). En plus, les réponses des cytokines et des facteurs de croissance sur la résorption osseuse sont souvent partiellement dépendantes de la production de prostaglandines. Ainsi, le PGE₂ agit comme facilitateur ou majorateur des réponses résorptives des cytokines (ex : l'IL-1) et des facteurs de croissance (ex : le bFGF et le TGF α). En effet, Lorenzo et al ont démontré que l'IL-1 en combinaison avec le TGF α stimulait la résorption osseuse, et que leurs effet était dépendant des prostaglandines (Lorenzo et Centrella, 1988). De plus, Kage et al démontrèrent aussi que le bFGF stimule la

synthèse de PGE_2 ce qui par conséquent augmente la résorption osseuse (Kage, 1999). Ainsi, un équilibre du niveau de PGE_2 doit être atteint dans l'ostéoblaste OA, c'est pourquoi le pourcentage d'inhibition obtenu avec la licofélone est assez conservateur. En effet, nos travaux ont démontré que les niveaux de PGE_2 des ostéoblastes normaux sont environ 2 à 4 fois plus faibles que ceux des ostéoblastes OA. Ainsi, une inhibition de 61.2% par la licofélone réduit le PGE_2 des ostéoblastes OA au niveau de celui des ostéoblastes normaux.

L'EFFET DU LICOFÉLONE SUR LE LTB_4 :

Puisque jusqu'à présent aucune recherche n'a démontré que les ostéoblastes sont capables de produire des leukotriènes, l'un des nos buts premiers fut de déterminer l'existence de ces eicosanoïdes dans les ostéoblastes. Comme la licofélone est un inhibiteur de la synthèse des leukotriènes nous avons aussi déterminé si une telle inhibition se produisait dans les ostéoblastes. Ainsi, nos résultats ont démontré qu'effectivement les ostéoblastes produisent du LTB_4 , et que chez les OA le niveau de LTB_4 est plus élevé comparativement aux normaux. En outre, la licofélone inhibe le LTB_4 de manière semblable à celle du PGE_2 dans les ostéoblastes. Nous savons que les produits de la 5-lipoxygénase jouent un rôle important dans l'inflammation. Les leukotriènes sont de puissants médiateurs de l'inflammation et sont impliqués dans la pathophysiologie des maladies inflammatoires chroniques et aiguës comme l'arthrose, l'arthrite, et l'asthme (Lewis, Austen et al., 1990).

Puisque les ostéoblastes produisent des leukotriènes et possèdent des récepteurs pour ceux-ci tels que nous l'avons démontré ici, ils doivent donc jouer un rôle important dans le métabolisme osseux. Nos expériences avec la licofélone allaient nous démontrer de quelle manière ceci pouvait avoir lieu. Tout d'abord, l'implication de LTB₄ exogène dans le métabolisme osseux a déjà été démontrée. Des recherches ont prouvé que l'addition de LTB₄ stimule la résorption osseuse *in vivo* et *in vitro* (Garcia, Boyce et al., 1996). Ainsi, quand on injecte du LTB₄ dans les calvaria de souris, il y a une augmentation significative du nombre d'ostéoclastes par unité de surface (Garcia, Boyce et al., 1996). Meghji et al ont démontré aussi que le LTB₄ est un activateur très puissant de la résorption osseuse dans les calvaria de souris (Meghji, Sandy et al., 1988). Ces études indiquent donc que les métabolites de la 5-LO stimulent le recrutement, la formation et l'activation des ostéoclastes. La résorption chez l'OA est semblable à celle des normaux donc les leukotriènes n'auraient aucun effet au niveau du catabolisme osseux dans l'arthrose. D'un autre côté, très peu d'études ont été effectuées sur les effets des métabolites de la 5-LO sur la fonction des ostéoblastes. Wei Ren et al ont démontré que les leukotriènes, spécifiquement le LTB₄, inhibent la prolifération des ostéoblastes (Ren et Dziak, 1991). Le LTB₄ augmenterait, d'autre part, la libération intracellulaire du calcium dans les ostéoblastes dérivés des calvarias de souris néonatales (Sandy, Meikle et al., 1991). Les effets du stress mécanique combiné avec l'utilisation d'inhibiteurs de leukotriènes a aussi démontré une augmentation de la formation osseuse et un blocage de la résorption osseuse. Ces études

supportent l'hypothèse que les métabolites de la 5-LO sont des régulateurs négatifs de la formation osseuse (Collins, 1987).

D'autre part, nous savons que le turnover dans l'arthrose est accéléré, ce qui produit une hypominéralisation de l'os sous-chondral, réduit sa rigidité mais augmente son épaissement. En effet, récemment Mansell et Bailey ont démontré que les explants d'os sous-chondral trabéculaire arthrosique isolés de têtes fémorales étaient hypominéralisés, puisque le ratio calcium/collagène était réduit chez l'OA comparativement aux normaux (Mansell et Bailey, 1998). L'arthrose serait donc reliée à une augmentation du turnover osseux. Notre recherche sur la licofélone nous a démontré qu'il était capable de modifier certains mécanismes dans les ostéoblastes qui contribuent à cette altération du remodelage osseux chez les patients arthrosiques. La licofélone modifie les niveaux de biomarqueurs des ostéoblastes comme l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline qui eux jouent un rôle important dans la minéralisation osseuse. Cet effet de la licofélone est dû au LTB₄ et non au PGE₂ puisqu'un inhibiteur sélectif de la FLAP reproduit ces effets mais non un inhibiteur sélectif de COX. De plus, l'addition de LTB₄ exogène stimule la sécrétion d'ostéocalcine par les ostéoblastes normaux. Ainsi, les effets produits sur les biomarqueurs des ostéoblastes et sur la FLAP par la licofélone modifient le métabolisme cellulaire des ostéoblastes arthrosiques et pourraient les conduire à ressembler à des ostéoblastes normaux. Par ailleurs, nous pouvons déduire que les métabolites de la 5-LO à des niveaux élevés dans les ostéoblastes

pourraient être responsables de l'augmentation de la libération de l'ostéocalcine comme c'est le cas dans l'arthrose. Ainsi, l'inhibition simultanée de la synthèse du LTB₄ et du PGE₂ par les inhibiteurs doubles serait préférable dans l'arthrose.

Un autre point favorable pour cette inhibition simultanée est que ces deux métabolites peuvent agir en synergie. Le LTB₄ est un médiateur de la perméabilité vasculaire et cet effet peut être seulement observé en présence d'un vasodilatateur comme le PGE₂. Évidemment, le LTB₄ produit aussi des effets secondaires très nuisibles et cause des dommages gastriques. Les leukotriènes induisent la vasoconstriction gastrique, augmentent la perméabilité vasculaire, entraînent la perte de la barrière de mucosité, et stimulent la sécrétion des acides gastriques et de pepsine (Rainsford, 1999). De cette façon, les effets secondaires potentiels produits par les leukotriènes peuvent être abolis en utilisant un inhibiteur double.

Dans un autre ordre d'idée, puisque les leukotriènes et les prostaglandines proviennent d'un même précurseur, l'acide arachidonique, il ne serait pas impossible que l'inhibition d'un des mécanismes produite par les AINS classiques entraîne un court-circuit vers l'autre mécanisme qui est de produire des leukotriènes. Cette hypothèse a été vérifiée par nos expériences réalisées dans les ostéoblastes. En effet, l'inhibition chronique de COX-2 avec le NS-398 a démontré une augmentation du niveau basal de LTB₄ dans les ostéoblastes OA. D'autre part, pour déterminer à quel niveau de la production

de LTB₄ le NS-398 intervenait, nous avons effectué des expériences de RT-PCR pour détecter la 5-LO et la FLAP. De cette façon, nous avons démontré que le niveau de la 5-LO ne change pas beaucoup lors de l'utilisation de NS-398 chronique ou du licofélone (Figure : R.S.1). Par contre, un changement visible du niveau de la FLAP a été observé avec ces deux même inhibiteurs dans les ostéoblastes (Figure : R.S.2). Comme contrôle interne de ces deux RT-PCRs nous avons utilisés le gène ancillaire GAPDH (non présenté dans Fig R.S.1). Nos résultats permettent aussi d'affirmer que les chondrocytes possèdent moins de FLAP que les ostéoblastes, une situation qui expliquerait les très faibles niveaux de leukotriènes produits par ces cellules (Wittenberg, 1993), ce qui nous permet d'assumer que les leukotriènes ne jouent pas un rôle très important dans les chondrocytes. Ainsi, la FLAP serait le facteur le plus important dans la régulation des leukotriènes produits par les ostéoblastes OA. En effet, la FLAP se lie à l'acide arachidonique ce qui permet d'augmenter l'efficacité avec laquelle l'acide arachidonique est présenté à la 5-LO. Ainsi une inhibition de la FLAP produit une diminution de la formation des métabolites de la 5-LO puisque l'acide arachidonique n'est plus disponible pour être transformé par la 5-LO. En plus, la FLAP aurait aussi comme fonction de maintenir la conformation active de la 5-LO. Donc, cette inhibition diminuerait la forme active de la 5-LO ce qui subséquemment diminue la formation des leukotriènes.

En conclusion, nos résultats ainsi que les résultats de deux autres travaux effectués avec la licofélone démontrent qu'elle pourrait "normaliser" le

fonctionnement des ostéoblastes arthrosiques. En effet, une étude publiée en mars 2001 (Gay, Neidhart et al., 2001) a démontré que la licofélone (ML-3000) réduit la prolifération cellulaire dans les synoviosites, l'érosion de l'os et du cartilage ainsi que la fréquence d'apparition du pannus dans un modèle *in vivo* d'arthrite rhumatoïde. D'autre part, Jovanovic et al (Jovanovic, Fernandes et al., 2001) ont récemment démontré que la licofélone chez le chien pouvait réduire la progression de l'arthrose induite *in vivo* par la résection du ligament croisé. Ainsi, ils ont obtenu une réduction du développement des lésions dans le cartilage, et une diminution des altérations de l'os sous-chondral du plateau tibial. La licofélone diminuerait aussi deux facteurs clés qui jouent un rôle important dans la pathophysiologie des lésions arthrosiques : les niveaux de collagénase-1 du cartilage et de IL-1 β dans la membrane synoviale. Leur étude confirme notre hypothèse selon laquelle l'effet du licofélone est médié par le LTB₄, puisque les effets observés sur ces facteurs passe aussi par cette voie. D'autre part, il est possible de spéculer que les résultats obtenus dans notre laboratoire pour le carprofen (Pelletier, 2000) et la diacérein (Pelletier, 2001) soient reliés à un effet produit sur les leukotriènes, étant donné que ces deux AINS ont des effets semblables à la licofélone sur les biomarqueurs des ostéoblastes en plus de réduire la progression de l'OA. Enfin, nous pouvons donc dire que la licofélone, ayant un excellent profil pharmacologique, pourrait être le médicament du futur dans les maladies arthrosiques à cause de son

efficacité, de son absence presque totale d'effets secondaires, ainsi que pour sa contribution au ralentissement de la progression des lésions arthrosiques/arthritiques dans les modèles animaux.

E: CONCLUSION

L'arthrose est une maladie idiopathique ayant un processus biologique complexe et dont son point d'origine n'est pas encore défini. Présentement, les traitements de la maladie avec les AINS se concentrent à soulager la douleur et diminuer l'inflammation mais non à modifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie. Notre étude a démontré que la licofélone, un inhibiteur double de la synthèse des leukotriènes et des prostaglandines, est plus qu'un simple AINS comparativement aux autres. Nos résultats sur les ostéoblastes démontrent une inhibition significative de la synthèse des eicosanoïdes, spécifiquement du LTB₄ et du PGE₂. D'autre part, nos études nous ont permis d'analyser le rôle joué par le leukotriène B₄ dans le fonctionnement des ostéoblastes arthrosiques. En effet, nous avons prouvé que l'inhibition de la synthèse du LTB₄ a pour effet de diminuer la synthèse de l'ostéocalcine et d'augmenter l'activité de la phosphatase alcaline. Par ailleurs, la licofélone peut produire ces résultats via son effet inhibiteur sur la synthèse du LTB₄ et non sur la synthèse du PGE₂. En plus, nos données préliminaires ont démontré que la FLAP serait la protéine principale qui est affectée par la licofélone, et que ceci modifierait la synthèse des leukotriènes. Puisque, la licofélone est capable de modifier ce mécanisme dans les ostéoblastes et que celui-ci contribue au remodelage anormal osseux chez les patients OA, l'utilisation de ce médicament pourrait protéger de la progression de l'arthrose s'il ait démontré que l'os sous-chondral est la cause principale de cette maladie.

Suite aux résultats obtenus nous pouvons établir l'hypothèse que le LTB₄ pourrait jouer d'autres rôles importants dans la physiologie de la cellule ostéoblastique, et qu'ils seraient étroitement liés aux mécanismes métaboliques des ostéoblastes. Deux idées intéressantes d'examiner seraient: 1) L'étude des facteurs responsables de l'augmentation du niveau de LTB₄ dans les ostéoblastes OA. Nos résultats ont démontré que le niveau de LTB₄ chez l'OA comparativement aux normaux est élevé. Plusieurs cytokines et facteurs de croissance ont été jugés importants dans la progression de l'OA. Un candidat est important à considérer est le TGF-beta. Il faudrait étudier si ce facteur provoque une modulation du niveau et/ou l'activité de la FLAP. En effet, l'élucidation d'une modulation probable de FLAP par ce facteur est importante, étant donné que cette protéine représente le facteur régulateur primordial de la synthèse du LTB₄. 2) D'autre part, il serait intéressant d'analyser s'il existe une régulation simultanée entre la PTH et le LTB₄. Une des fonctions de la PTH est d'augmenter la résorption osseuse via l'induction de la formation des ostéoclastes. L'ostéoclastogénèse est médiée par l'augmentation de cAMP dans les ostéoblastes. La PTH augmente le niveau de cAMP dans les ostéoblastes. Les changements physiologiques dans les cellules ostéoblastiques OA reliés à l'irrégularité de la signalisation de la PTH ne sont pas dus à la protéine PTH (Ligand) car son niveau est constant, mais plutôt à la modulation de l'expression de son récepteur. Ainsi, l'analyse du niveau d'expression du récepteur de la PTH par RT-PCR à des concentrations différentes de LTB₄ serait une bonne indication pour savoir s'il existe un «cross-talk» d'activité entre la PTH et le LTB₄.

F: RÉFÉRENCES

Abramovitz, M., E. Wong, et al. (1993). 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem* **215**(1): 105-11.

Akizuki, S., V. C. Mow, et al. (1986). Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *J Orthop Res* **4**(4): 379-92.

Anderson, J. J. and D. T. Felson (1988). Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol* **128**(1): 179-89.

Aubin JE, Bonnelye E. (2000). Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* **11**(11): 905-13

Bab, I., B. A. Ashton, et al. (1986). Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci* **84**: 139-51.

Baron, R. (1996). Anatomy and Ultrastructure of Bone. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. M. D. Murray J. Favus. Philadelphia, Lippincott- Raven: 3-10.

Beresford, J. N. (1989). Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop*(240): 270-80.

Bland, J. H. (1983). The reversibility of osteoarthritis: a review. *Am J Med* **74**(6A): 16-26.

Boyce BF, H. D., Wright KR, Xing L, Dai A. (1999). Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest* **79**: 83-94.

Brown, A. J., A. Dusso, et al. (1999). Vitamin D. *Am J Physiol* **277**(2 Pt 2): F157-75.

Buckwalter, J. A., J. Martin, et al. (2000). Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* **49**: 481-9.

Buckwalter JA, M. H. (1997). Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg* **79A**: 600-611.

- Buckwalter JA, M. H. (1997). Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg* **79A**: 612-632.
- Burgeson, R. E. and M. E. Nimni (1992). Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop*(282): 250-72.
- Canalis, E. (1980). Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest* **66**(4): 709-19.
- Canalis, E. (1996). Regulation of bone remodeling. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. M. D. Murray J. Favus. Philadelphia, Lippincott- Raven: 29-34.
- Canalis, E., M. Centrella, et al. (1989). Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* **83**(1): 60-5.
- Canalis, E., S. Rydziel, et al. (1995). Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology* **136**(4): 1348-54.
- Canalis E, H. J., Raisz LG (1994). Parathyroid Hormone: Anabolic and catabolic effects on bone and interactions with growth factors. The parathyroids. M. R. Bilezikian JP, Levine MA. New York: 65-82.
- Carlson, C. S., R. F. Loeser, et al. (1996). Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J Bone Miner Res* **11**(9): 1209-17.
- Carty TJ, M. A., Rasamune J. (1988). Modulation of AA metabolites in the treatment of rheumatoid arthritis. Annual reports in medicinal chemistry. A. RC. New York, Academic Press: 181-9.
- Centrella, M., T. L. McCarthy, et al. (1987). Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* **262**(6): 2869-74.
- Collins JL, D. J., Cederquis R, Simmelink JW, Enlow DH (1987). Stimulation of bone development by mechanical stress, and inhibition of leukotriene biosynthesis.

Program of the 65th General Session, International Association for Dental Research Annual Session,, American Association for Dental Research Chicago.

Cooper, C. (1995). Occupational activity and the risk of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* **43**: 10-2.

Davis, M. A., W. H. Ettinger, et al. (1988). The role of metabolic factors and blood pressure in the association of obesity with osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* **15**(12): 1827-32.

Davis MA, E. W., Neuhaus JM, Cho SA, Houck WW (1989). The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee. *Am J Epidemiol* **130**: 278-288.

Davis MA, E. W., Neuhaus JM, Hauck WW (1998). Sex differences in osteoarthritis of the knee: the role of obesity. *Am J Epidemiol* **127**: 1019-1030.

Devchand, P. R., H. Keller, et al. (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* **384**(6604): 39-43.

Dieppe, P. (1995). The classification and diagnosis of osteoarthritis. Osteoarthritic Disorders. G. V. Luettner KE. Rosemont, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons: 5-12.

Dodge, G. R. and A. R. Poole (1989). Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* **83**(2): 647-61.

Dr Mitrovic, D. M. (2000). Le cartilage un tissu conjonctif très différencié. Toulouse, France, Éditions Privat.

Dubois, R. N., S. B. Abramson, et al. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J* **12**(12): 1063-73.

Ducy, P., C. Desbois, et al. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382**(6590): 448-52.

- Dyer RD, C. D. (1997). Dual inhibitors of prostaglandin and leukotriene biosynthesis. *Current Pharmaceutical Design* **3**: 463-72.
- Ewald, F. C., R. Poss, et al. (1982). Hip cartilage supported by methacrylate in canine arthroplasty. *Clin Orthop*(171): 273-9.
- Eyre, D. R. (1996). Biochemical Markers of Bone Turnover. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. M. J. F. M.D. Philadelphia, Lippincott- Raven: 114-119.
- Fabio Celotti, S. L. (2001). Anti-inflammatory drugs: New multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacological Research* **43**(5): 429-36.
- Felson, D. (1995). The epidemiology of osteoarthritis: Prevalence and risk factors. Osteoarthritic Disorders. G. V. Kuettner KE. Rosemont, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons: 13-24.
- Felson, D. (1998). Epidemiology of osteoarthritis. Osteoarthritis. D. M. Brand KD, Lohmander LS. Oxford, England, Oxford University Press: 13-24.
- Felson, D. T. (1994). Do occupation-related physical factors contribute to arthritis? *Baillieres Clin Rheumatol* **8**(1): 63-77.
- Felson, D. T., J. J. Anderson, et al. (1988). Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* **109**(1): 18-24.
- Fessler, L. I., N. P. Morris, et al. (1975). Procollagen: biological scission of amino and carboxyl extension peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(12): 4905-9.
- Fiorucci, S., R. Meli, et al. (2001). Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol* **62**(11): 1433-8.
- Garcia, C., B. F. Boyce, et al. (1996). Leukotriene B₄ stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* **11**(11): 1619-27.
- Garnero P, Gineyts E, Cristgau S, Finck B, Delmas PD. (2002). Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl-pyridinoline and type II collagen C-

telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **46** (1): 21-30.

Gay, R. E., M. Neidhart, et al. (2001). Dual inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenases 1 and 2 by ML3000 reduces joint destruction in adjuvant arthritis. *J Rheumatol* **28**(9): 2060-5.

Goldthwait, J. (1904). The differential diagnosis and treatment of the so called rheumatoid disease. *Bost Med Surg J* **151**: 529-534.

Gray, M. L., A. M. Pizzanelli, et al. (1988). Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res* **6**(6): 777-92.

Gregory R. Mundy, M. D. (1996). Bone-Resorbing Cells. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. M. D. Murray J. Favus. Philadelphia, Lippincott- Raven: 16-24.

Gronowicz, G. A., P. M. Fall, et al. (1994). Prostaglandin E2 stimulates preosteoblast replication: an autoradiographic study in cultured fetal rat calvariae. *Exp Cell Res* **212**(2): 314-20.

Grynopas, M. D., B. Alpert, et al. (1991). Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* **49**(1): 20-6.

Guilak, F., A. Ratcliffe, et al. (1994). Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* **12**(4): 474-84.

Hartz, A. J., M. E. Fischer, et al. (1986). The association of obesity with joint pain and osteoarthritis in the HANES data. *J Chronic Dis* **39**(4): 311-9.

Hauschka, P. V., J. B. Lian, et al. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* **69**(3): 990-1047.

Hayashi, S., T. Yamane, et al. (1998). Commitment and differentiation of stem cells to the osteoclast lineage. *Biochem Cell Biol* **76**(6): 911-22.

Herschman, H. (1998). Recent progress in the cellular and molecular biology of prostaglandin synthesis. *Trends Cardiovasc Med* **8**: 145-150.

- Hilal, G., J. Martel-Pelletier, et al. (1999). Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum* **42**(10): 2112-22.
- Hilal, G., J. Martel-Pelletier, et al. (1998). Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* **41**(5): 891-9.
- Hirsch, R., M. Lethbridge-Cejku, et al. (1998). Familial aggregation of osteoarthritis: data from the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Arthritis Rheum* **41**(7): 1227-32.
- Hirsch, R., M. Lethbridge-Cejku, et al. (1996). Association of hand and knee osteoarthritis: evidence for a polyarticular disease subset. *Ann Rheum Dis* **55**(1): 25-9.
- Hochberg MC, L.-C. M., Scott WW Jr, Reichle R, Plato CC, Tobin JD (1995). The association of body weight, body fatness and body fat distribution with osteoarthritis of the knee: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Rheumatol* **22**: 488-493.
- Hock, J. M., M. Centrella, et al. (1988). Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* **122**(1): 254-60.
- Holgate S, D. S.-E., Ed. (1997). SRS-A to leukotrienes: the dawning of a new treatment. Oxford, UK: Blackwell Science.
- Hollander, A. P., I. Pidoux, et al. (1995). Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* **96**(6): 2859-69.
- Hough, A. (1996). Pathology of osteoarthritis. Arthritis and allied conditions. W. J. Koopman. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1945-1968.
- Howell DS, S. A., Pita JC (1982). The pathogenesis of degenerative joint disease. Current concepts. New York, Scope Publication: 5-28.

Hyldstrup, L., I. Clemmensen, et al. (1988). Non-invasive evaluation of bone formation: measurements of serum alkaline phosphatase, whole body retention of diphosphonate and serum osteocalcin in metabolic bone disorders and thyroid disease. *Scand J Clin Lab Invest* **48**(7): 611-9.

Imhof, H., M. Breitenseher, et al. (1999). Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging* **10**(3): 180-92.

J. Belaisch, S. O. (1998). Les marqueurs biochimiques de la perte osseuse. *Contracept. Fertil. Sex.* **26**(9): 621-626.

J. McLaughlan, R. S., A.T. Cole, B.B. Scott, D. Jenkins, C. J. Hawkey (1996). Increased inducible cyclooxygenase associated with treatment failure in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **110**: A964.

Jean-Pierre Pelletier, D. L., Dragan V. Jovanovic, Viorica Lascau-Coman, François-Cyril Jolicoeur, George Hilal, Julio C. Fernandes, and Johanne Martel Pelletier (2000). Carprofen Simultaneously Reduces Progression of Morphological Changes in Cartilage and Subchondral Bone in Experimental Dog Osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology* **27**(12): 2893-2902.

Jean-Pierre Pelletier, D. L., Pascal Reboul, François Mineau, Julio C. Fernandes, Pierre Sabouret, and Johanne Martel-Pelletier (2001). Diacerein Reduces the Excess Synthesis of Bone Remodeling Factors by Human Osteoblast Cells from Osteoarthritic Subchondral Bone. *The Journal of Rheumatology* **28**(4): 814-823.

Jean-Pierre Pelletier, J. M.-P., David S. Howell (2001). Etiopathogenesis of osteoarthritis. Arthritis and allied conditions. W. J. Koopman. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins: 2195-2211.

Jenkins, M. A., C. B. Steer, et al. (1999). An unusual alkaline phosphatase isoenzyme associated with gastric carcinoma. *Ann Clin Biochem* **36**(Pt 6): 743-8.

John R. Vane, R. M. B. (2001). Formation and actions of prostaglandins and inhibition of their synthesis. Therapeutic roles of selective COX-2 inhibitors. J. R. V. a. R. M. Botting. London, William Harvey Press: 1-47.

Johnson, A. G. (1998). NSAIDs and blood pressure. Clinical importance for older patients. *Drugs Aging* **12**(1): 17-27.

Johnson, J. A., J. P. Grande, et al. (1996). Ontogeny of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in fetal rat bone. *J Bone Miner Res* **11**(1): 56-61.

Jovanovic, D. V., J. C. Fernandes, et al. (2001). In vivo dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis: suppression of collagenase 1 and interleukin-1beta synthesis. *Arthritis Rheum* **44**(10): 2320-30.

Kage K, F. N., Oh-hara T, Ogata E, Fujita T, Tsuruo T. (1999). Basic fibroblast growth factor induces cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells derived from bone. *Biochem Biophys Res* **254**(1): 259-63.

Kajii, T., K. Suzuki, et al. (1999). Long-term effects of prostaglandin E2 on the mineralization of a clonal osteoblastic cell line (MC3T3-E1). *Arch Oral Biol* **44**(3): 233-41.

Keen, R. W., D. J. Hart, et al. (1997). Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. *Arthritis Rheum* **40**(8): 1444-9.

Kellgren JH, L. J. (1952). Rheumatism in miners: X-ray study. *Br J Indust Med* **9**: 197-207.

Kellgren JH, L. J., Bier F. (1963). Genetic factors in generalized osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **22**: 237-255.

Kempson, G. E., H. Muir, et al. (1973). The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* **297**(2): 456-72.

Kivirikko KI, M. R. (1984). Biosynthesis of the collagens. Extracellular matrix biochemistry. R. A. Piez KA. New York, Elsevier: 1328-32.

Kjaersgaard-Andersen, P., A. Nafei, et al. (1993). Indomethacin for prevention of heterotopic ossification. A randomized controlled study in 41 hip arthroplasties. *Acta Orthop Scand* **64**(6): 639-42.

Koyama I, M. M., Matsuzaki H, Sakagishi Y, Komoda T. (1985). Sugar-chain heterogeneity of human alkaline phosphatases: differences between normal and tumour-associated isoenzymes. *Am J Dis Child* **139**: 736-40.

Kutchera, W., D. A. Jones, et al. (1996). Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4816-20.

Kuttner K, G. W. (1995). Osteoarthritic Disorders. Rosemont xxi-v, American Academy of Orthopaedic Surgeons.

Lajeunesse, D., G. Hilal, et al. (1999). Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**(3): 321-2.

Lane, N. E., D. A. Bloch, et al. (1990). Running, osteoarthritis, and bone density: initial 2-year longitudinal study. *Am J Med* **88**(5): 452-9.

Lane, N. E., D. A. Bloch, et al. (1986). Long-distance running, bone density, and osteoarthritis. *Jama* **255**(9): 1147-51.

Lane, N. E. and J. A. Buckwalter (1993). Exercise: a cause of osteoarthritis? *Rheum Dis Clin North Am* **19**(3): 617-33.

Lane, N. E., B. Michel, et al. (1993). The risk of osteoarthritis with running and aging: a 5-year longitudinal study. *J Rheumatol* **20**(3): 461-8.

Laufer, S. (2001). Discovery and Development of ML 3000. *Inflammopharmacology In Press*.

Laufer S, Tries S., Augustin J, Dannhardt G (1994). Pharmacological profile of a new pirrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneim-Forsch/Drug Res* **44**: 629-36.

Lawrence, R. C., M. C. Hochberg, et al. (1989). Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *J Rheumatol* **16**(4): 427-41.

Lee, A. J., S. Hodges, et al. (2000). Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* **37**(Pt 4): 432-46.

Lewis, R. A., K. F. Austen, et al. (1990). Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* **323**(10): 645-55.

Li, B. and R. M. Aspden (1997). Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res* **12**(4): 641-51.

Li, Y., T. Smith, et al. (1998). The membrane association sequences of the prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 isozymes. *J Biol Chem* **273**(45): 29830-7.

Lian, J. B., G. S. Stein, et al. (1998). Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* **31**: 62-72.

Lipsky, P. E., P. Brooks, et al. (2000). Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med* **160**(7): 913-20.

Lorenzo JA, S. S., Centrella M. (1988). Interleukin-1 in combination with transforming growth factor-alpha produces enhanced bone resorption in vitro. *Endocrinology* **123**(5): 2194-2200.

Malinin, T. and E. A. Ouellette (2000). Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis Cartilage* **8**(6): 483-91.

Mansell, J. P. and A. J. Bailey (1998). Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest* **101**(8): 1596-603.

Marshall, L. A. and A. K. Roshak (1998). Utility of oligonucleotides as tools to study the function and regulation of 85 kDa phospholipase A2. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **8**(2): 153-7.

Martel-Pelletier J, D. B. J., Lajeunesse D. (1999). Biochemical Factors in joint articular tissue degradation in osteoarthritis. Osteoarthritis: clinical and experimental

- aspects. P. J. Reginster JY, Martel-Pelletier J, et al. Berlin, Springer-Verlag: 156-187.
- Martel-Pelletier J, H. G., Pelletier JP, et al. (1997). Evidence for increased metabolic activity in human osteoarthritic subchondral bone explants. *Arthritis Rheum* **40**: (#9 supplement) S182.
- Matsumoto, T., C. D. Funk, et al. (1988). Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(1): 26-30.
- McCarthy, T. L., M. Centrella, et al. (1989). Parathyroid hormone enhances the transcript and polypeptide levels of insulin-like growth factor I in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* **124**(3): 1247-53.
- McCarthy, T. L., M. Centrella, et al. (1989). Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* **124**(1): 301-9.
- Mead J. F, A.-S. R. b., Howton D. R, Popjak G. (1986). Prostaglandins, thromboxanes, and prostacyclin. Lipids: Chemistry, Biochemistry, and Nutrition. M. J. F. New York, Plenum Press: 149-216.
- Mee, A. P., J. A. Hoyland, et al. (1996). Demonstration of vitamin D receptor transcripts in actively resorbing osteoclasts in bone sections. *Bone* **18**(4): 295-9.
- Meghji, S., J. R. Sandy, et al. (1988). Stimulation of bone resorption by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Prostaglandins* **36**(2): 139-49.
- Melchiorri, C., R. Meliconi, et al. (1998). Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **41**(12): 2165-74.
- Merry, A. H., R. Harwood, et al. (1976). Identification and partial characterisation of the non-collagenous amino- and carboxyl-terminal extension peptides of cartilage procollagen. *Biochem Biophys Res Commun* **71**(1): 83-90.
- Miyauchi, A., K. A. Hruska, et al. (1990). Osteoclast cytosolic calcium, regulated by voltage-gated calcium channels and extracellular calcium, controls podosome assembly and bone resorption. *J Cell Biol* **111**(6 Pt 1): 2543-52.

Morham, S. G., R. Langenbach, et al. (1995). Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* **83**(3): 473-82.

Moskowitz, R. (1999). Bone remodeling in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**: 323-324.

Mundy, G. R. (1993). Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* **8 Suppl 2**: S505-10.

Mundy, G. R. (1996). Bone-Resorbing Cells. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. M. J. F. M.D. Philadelphia, Lippincott-Raven: 16-24.

Needleman, P. and P. C. Isakson (1997). The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol* **24 Suppl 49**: 6-8.

Netter F.H., M. D. (1987). The CIBA collection of medical illustrations. New Jersey, CIBA-GEIGY Corporation.

Olsen, B. R., N. A. Guzman, et al. (1977). Purification and characterization of a peptide from the carboxy-terminal region of chick tendon procollagen type I. *Biochemistry* **16**(13): 3030-6.

Panush, R. S. and N. E. Lane (1994). Exercise and the musculoskeletal system. *Baillieres Clin Rheumatol* **8**(1): 79-102.

Patrick M, M. A., Ward AM, et al. (1989). HLA-A, B antigens and alpha 1-antitrypsin phenotypes in nodal generalized osteoarthritis and erosive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **48**: 470-475.

Pfeilschifter, J., S. M. Seyedin, et al. (1988). Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J Clin Invest* **82**(2): 680-5.

Poole, A. R. (2001). Cartilage in health and disease. Arthritis and allied conditions. W. J. Koopman. Philadelphia, PA, Lippincott Williams&Wilkins.

Poole, A. R., I. Pidoux, et al. (1982). An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *J Cell Biol* **93**(3): 921-37.

Poole AR, A. M., Hollander AP. (1995). Cellular biology of cartilage degradation. Mechanisms and models in rheumatoid arthritis. P. R. Henderson B, Edwards J. London, Academic Press: 163-204.

Poole, C. A., M. H. Flint, et al. (1987). Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res* **5**(4): 509-22.

Praemer A, F. S., Rice DP (1992). Musculoskeletal Conditions in the United States. Park Ridge, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons.

Price, J. S., B. O. Oyajobi, et al. (1994). The cell biology of bone growth. *Eur J Clin Nutr* **48 Suppl 1**: S131-49.

Price, P. A. and S. A. Baukol (1980). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* **255**(24): 11660-3.

Puzas, J. (1993). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. New York, Raven Press.

Radin, E. L. and I. L. Paul (1970). Does cartilage compliance reduce skeletal impact loads? The relative force-attenuating properties of articular cartilage, synovial fluid, periarticular soft tissues and bone. *Arthritis Rheum* **13**(2): 139-44.

Radin, E. L., I. L. Paul, et al. (1970). Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum* **13**(4): 400-5.

Radin, E. L. and R. M. Rose (1986). Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop*(213): 34-40.

Radin Eric L, B. R. D., Martin R. B, Burr D. B, Caterson B, Goodwin C. (1985). Mechanical factors influencing cartilage damage. Osteoarthritis- Current Clinical and Fundamental Problems. P. J. G. Paris, CIBA-Geigy: 90-99.

Rainsford, K. D. (1993). Leukotrienes in the pathogenesis of NSAID-induced gastric and intestinal mucosal damage. *Agents Actions* **39**(Spec No): C24-6.

Rainsford, K. D. (1999). Inhibition by leukotriene inhibitors, and calcium and platelet-activating factor antagonists, of acute gastric and intestinal damage in arthritic rats and in cholinomimetic-treated mice. *J Pharm Pharmacol* **51**(3): 331-9.

Rainsford, K. D. (1999). Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med* **107**(6A): 27S-35S; discussion 35S-36S.

Raisz, L. G. and P. M. Fall (1990). Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology* **126**(3): 1654-9.

Reddy, S. T. and H. R. Herschman (1996). Transcellular prostaglandin production following mast cell activation is mediated by proximal secretory phospholipase A2 and distal prostaglandin synthase 1. *J Biol Chem* **271**(1): 186-91.

Redler, I. (1974). A scanning electron microscopic study of human normal and osteoarthritic articular cartilage. *Clin Orthop* **0**(103): 262-8.

Ren, W. and R. Dziak (1991). Effects of leukotrienes on osteoblastic cell proliferation. *Calcif Tissue Int* **49**(3): 197-201.

Reuter, B. K., S. Asfaha, et al. (1996). Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* **98**(9): 2076-85.

Rizkalla, G., A. Reiner, et al. (1992). Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest* **90**(6): 2268-77.

Robinson, R. (1923). The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. *Biochem J* **17**: 286-293.

Saal, D. B. (1993). L'arthrose et les affectations rhumatismales. Paris, Albin Michel S.A.

Saied, A., E. Cherin, et al. (1997). Assessment of articular cartilage and subchondral bone: subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro. *J Bone Miner Res* **12**(9): 1378-86.

Samuelsson, B. (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**(4597): 568-75.

Sandy, J. R., M. C. Meikle, et al. (1991). Leukotriene B₄ increases intracellular calcium concentration and phosphoinositide metabolism in mouse osteoblasts via cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-independent pathways. *Endocrinology* **129**(2): 582-90.

Seibel, M. J. (2000). Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int* **11**(Suppl 6): S18-29.

Serhan, C. N. (1996). Inflammation. Signalling the fat controller. *Nature* **384**(6604): 23-4.

Serhan, C. N. (2001). Eicosanoids. Arthritis and allied conditions. W. J. Koopman. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins: 515-535.

Shinar, D. M. and G. A. Rodan (1990). Biphasic effects of transforming growth factor-beta on the production of osteoclast-like cells in mouse bone marrow cultures: the role of prostaglandins in the generation of these cells. *Endocrinology* **126**(6): 3153-8.

Silverman, E. S. and J. M. Drazen (1999). The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc Assoc Am Physicians* **111**(6): 525-36.

Smedsrod, B., J. Melkko, et al. (1990). Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *Biochem J* **271**(2): 345-50.

Smith, W. L., L. J. Marnett, et al. (1991). Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* **49**(3): 153-79.

Spector, T. D., F. Cicuttini, et al. (1996). Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *Bmj* **312**(7036): 940-3.

St-Arnaud R, A. A., and F. H. Glorieux (1996). Abnormal bone development in mice deficient for the vitamin D-24-hydroxylase gene. *J. Bone Min Res* **11**(Suppl.): S126.

Stinson, R. A. and B. A. Hamilton (1994). Human liver plasma membranes contain an enzyme activity that removes membrane anchor from alkaline phosphatase and converts it to a plasma-like form. *Clin Biochem* **27**(1): 49-55.

Sweet, M. B., E. J. Thonar, et al. (1977). Biochemical changes in progressive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **36**(5): 387-98.

Takiguchi, T., M. Kobayashi, et al. (1999). Effect of prostaglandin E2 on recombinant human bone morphogenetic protein-2-stimulated osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* **34**(7): 431-6.

Thompson, R. C., Jr. and T. R. Oegema, Jr. (1979). Metabolic activity of articular cartilage in osteoarthritis. An in vitro study. *J Bone Joint Surg Am* **61**(3): 407-16.

Thonar, E. J., M. B. Sweet, et al. (1978). Hyaluronate in articular cartilage: age-related changes. *Calcif Tissue Res* **26**(1): 19-21.

Tortora, G. (2001). Principes d'anatomie et de physiologie. France, Du Renouveau Pédagogique Inc.

Tries, S. (2001). The Pharmacological Profile of ML 3000: A new pyrrolizine derivative inhibits the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Inflammopharmacology*.

Ushiyama, T., H. Ueyama, et al. (1998). Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis. *J Rheumatol* **25**(1): 134-7.

Vaananen, H. K., H. Zhao, et al. (2000). The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* **113**(Pt 3): 377-81.

Vaillancourt, G. (1990). Arthrite et rhumatisme. Montréal, Les Presses de l'Université de Montréal.

Van Straalen JP, S. E., Prummel MF, Sanders GTB (1991). Bone alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* **201**: 27-34.

Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**(25): 232-9.

Vernejoul, M.-C. d. (1993). Cellules osseuses et remodelage osseux. médecine/sciences. **9**: 1192-203.

Westacott, C. I., G. R. Webb, et al. (1997). Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum* **40**(7): 1282-91.

Whittle BJR, V. J. (1987). Prostanoids as regulators of gastrointestinal function. Physiology of gastrointestinal tract. J. LR. New York, Raven Press: 143-180.

Wittenberg RH, W. R., Kleemeyer KS, Peskar BA (1993). In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. *Arthritis Rheum* **36**(10): 1444-50.

Woolley, D. E., M. J. Crossley, et al. (1977). Collagenase at sites of cartilage erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* **20**(6): 1231-9.

Wright, G. D., A. E. Hughes, et al. (1996). Association of two loci on chromosome 2q with nodal osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **55**(5): 317-9.

Yamamoto, S., K. Yamamoto, et al. (1998). Transcriptional regulation of fatty acid cyclooxygenases-1 and -2. *Int J Tissue React* **20**(1): 17-22.

Yokomizo, T., T. Izumi, et al. (2001). Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys* **385**(2): 231-41.

Yokomizo, T., K. Kato, et al. (2000). A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* **192**(3): 421-32.

Yokomizo, T., K. Masuda, et al. (2000). Leukotriene B4 receptor. Cloning and intracellular signaling. *Am J Respir Crit Care Med* **161**(2 Pt 2): S51-5.