

Université de Montréal

**Rôle de l'acide 12- Hydroxyeicosatétraénoïque dans la régulation des réponses inflammatoires et cataboliques dans les tissus articulaires dans la pathogenèse de l'arthrose**

*Par*

Habib Mba Dassi

Département de Microbiologie, Immunologie et Infectiologie,

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

En Microbiologie, Immunologie et Infectiologie

Août 2023

© Habib Mba Dassi, 2023

# Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

---

*Ce mémoire intitulé*

**Rôle de l'acide 12- Hydroxyeicosatétraénoïque dans la régulation des réponses inflammatoires et cataboliques dans les tissus articulaires dans la pathogenèse de l'arthrose**

*Présenté par*

**Habib Mba Dassi**

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

**Dr Walid Mourad**  
Président-rapporteur

**Dr Hassan Fahmi**  
Directeur de recherche

**Dre Johanne Martel-Pelletier**  
Codirecteur

**Dre Florina Moldovan**  
Membre du jury

## Résumé

L'arthrose (OA) est la maladie musculosquelettique la plus fréquente au monde et peut affecter toutes les articulations. L'arthrose est caractérisée par la dégradation progressive du cartilage, l'inflammation de la synoviale et le remodelage de l'os sous-chondral. Ces changements sont dus à une augmentation d'expression des médiateurs pro-inflammatoires tels que la cyclooxygénase 2 (COX-2) et de facteurs cataboliques, notamment les métalloprotéinases 1 et 13 (MMP-1 et 13).

Les métabolites de la 12-lipoxygénase jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. À la suite des réactions d'oxygénation / réduction de la 12 LOX, un facteur eicosanoïde particulier est produit: le 12-HydroxyEicosaTétraÉnoïque (12-HETE), dont le rôle dans la pathogenèse de l'OA n'est pas caractérisé.

L'objectif de ce travail est de définir le rôle de la 12-HETE dans la régulation des réponses inflammatoires et cataboliques dans les tissus articulaires, chondrocytes et synoviocytes, humains.

Nous avons démontré que la 12-HETE n'affecte pas la prolifération (test MTT) des chondrocytes et des synoviocytes et n'a aucun effet sur leur migration (test de rayure). Un traitement avec la 12-HETE augmente l'induction de l'expression de la COX-2 dans les deux types cellulaires. La 12-HETE n'avait aucun effet sur l'expression de la MMP-1 et la MMP-13.

La 12-HETE induit ses effets à l'aide d'un récepteur couplé à la protéine G : la GRP31. Nous avons décrit l'arthrose sur des coupes histologiques humaines, puis nous avons observé que l'expression de GPR31 était similaire dans le cartilage dégradé et le cartilage non dégradé. Finalement, nous avons montré que les chondrocytes et les synoviocytes expriment la GPR31 et son niveau est diminué en présence de l'interleukine-1 bêta (IL-1 $\beta$ ).

En conclusion, nous avons démontré que la 12-HETE a des effets divers sur les réponses inflammatoires et cataboliques dans les tissus articulaires : elle augmente l'expression de la cyclooxygénase 2 (COX-2) et n'a pas d'effet sur l'expression de la MMP-1 et la MMP-13.

**Mots-clés : Arthrose, 12-HETE, GRP31, COX-2, MMP-1, MMP-13, Synoviocytes, Chondrocytes.**

## Abstract

Osteoarthritis (OA) is the world's most common musculoskeletal disease and can affect all joints. Osteoarthritis is characterized by progressive degradation of cartilage, inflammation of the synovium and remodelling of the subchondral bone. These changes are due to increased expression of pro-inflammatory mediators such as cyclooxygenase 2 (COX-2) and catabolic factors including metalloproteinases 1 and 13 (MMP-1 and 13).

12-lipoxygenase metabolites play an important role in many physiological and pathological processes. Following the oxygenation/reduction reactions of 12 LOX, a particular eicosanoid factor is produced: 12-HydroxyEicosaTetraenoic (12-HETE), whose role in the pathogenesis of AO is uncharacterized.

This work aims to define the role of 12-HydroxyEicosaTetraenoic (12-HETE) in regulating inflammatory and catabolic responses in human joint tissues, chondrocytes and synoviocytes.

We have demonstrated that 12-HETE does not affect the proliferation (MTT assay) of chondrocytes and synoviocytes and has no effect on their migration (scratch assay). Treatment with 12-HETE increased the induction of COX-2 expression in both cell types. 12-HETE had no effects on MMP-1 and MMP-13 expression.

12-HETE induces its effects using a G protein-coupled receptor: GRP31. We described osteoarthritis on human histological sections and then observed that GPR31 expression was the same in degraded and non-degraded cartilage. Finally, we showed that chondrocytes and synoviocytes express GPR31 and its level is decreased in the presence of Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ).

In conclusion, we demonstrated that 12-HETE has different effects on inflammatory and catabolic responses in joint tissues by increasing COX-2 expression and has no effect on MMP-1 and MMP-13 expression.

**Keywords: Osteoarthritis, 12-HETE, GRP31, COX-2, MMP-1, MMP-13, Synoviocytes, Chondrocytes.**

# Table des matières

Université de Montréal.....	2
Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	14
Liste des sigles et abréviations.....	16
Remerciements.....	21
Chapitre 1 – Introduction.....	22
1. Présentation de l’arthrose.....	23
1.1. Définition de l’arthrite.....	23
1.2. Définition de l’arthrose.....	23
1.3. Historique de l’OA.....	23
1.4. Épidémiologie de l’OA.....	24
1.4.1. Prévalence et incidence de l’OA dans le monde.....	24
1.4.2. Au Canada.....	25
1.4.3. Au Québec.....	25
1.5. Les facteurs de risque.....	25
1.5.1. Les facteurs non-modifiables.....	25
1.5.2. Les facteurs modifiables.....	25
1.6. Symptômes de l’OA.....	27
1.7. Diagnostic de l’OA.....	28
1.8. Traitement de l’OA.....	29
1.8.1. La PEC pharmacologique.....	29
1.8.2. La PEC non-pharmacologique.....	31
1.8.3. Les traitements et cibles thérapeutiques d’avenir.....	31

1.9.	Prévention de l'OA .....	31
2.	Anatomie et tissus composant le genou .....	33
2.1.	Structure du genou .....	33
2.1.1.	Le cartilage articulaire .....	34
2.1.1.1.	Les chondrocytes .....	35
2.1.1.2.	La MEC .....	35
2.1.1.3.	Les fibres collagènes du type II.....	35
2.1.1.4.	Les protéoglycanes .....	35
2.1.2.	La membrane et le liquide synovial.....	36
2.1.2.1.	La membrane synoviale.....	36
2.1.2.2.	Le liquide synovial .....	38
2.2.	Les mécanismes pathologiques de l'OA.....	38
2.2.1.	La dégradation du cartilage .....	39
2.2.1.1.	Les métalloprotéinases .....	39
2.2.1.1.1.	Les ADAMTS.....	40
2.2.2.	Le stress oxydatif.....	40
2.2.2.1.	Production des radicaux libres.....	40
2.2.2.2.	Effets du stress oxydatif .....	41
2.2.3.	L'inflammation de la membrane synoviale.....	42
2.2.3.1.	Déroulement du processus inflammatoire dans l'OA.....	42
2.2.3.2.	Manifestation de l'état inflammatoire .....	43
2.2.4.	Le remodelage osseux .....	44
2.2.4.1.	Sur le plan morphologique .....	44
2.2.4.2.	Sur le plan physiologique .....	44
3.	Les facteurs de régulation impliqués dans l'OA .....	45

3.1. Facteurs cataboliques .....	45
3.1.1. Les cytokines .....	45
3.1.1.1. IL-1 $\beta$ .....	45
3.1.1.2. TNF- $\alpha$ .....	45
3.1.2. Les chimiokines .....	46
3.1.2.1. IL-8 .....	46
3.1.3. Les protéases.....	47
3.1.3.1. Les collagénases .....	47
3.1.3.2. Aggrécanase.....	47
3.1.4. Les médiateurs inflammatoires.....	47
3.1.4.1. iNOS .....	47
3.1.4.2. COX-2 .....	48
3.2. Facteurs anaboliques.....	48
3.2.1. Les cytokines anti-inflammatoires.....	48
3.2.1.1. IL-4 .....	48
3.2.1.2. IL-10 .....	49
3.2.2. Les chimiokines anti-inflammatoires .....	49
3.2.2.1. Le TGF- $\beta$ .....	49
3.2.2.2. L'IGF-1 .....	49
4. Les voies oxydatives des eicosanoïdes.....	50
4.1. L'acide arachidonique.....	51
4.2. Les cyclo-oxygénases (COX) .....	51
4.3. Le cytochrome P 450 .....	51
4.4. Les lipoxygénases .....	51
4.4.1. Localisation des LOX.....	52

4.4.2.	Classification et distribution des LOX .....	52
4.4.2.1.	Chez l'humain.....	53
4.4.2.2.	Chez la souris.....	53
4.4.3.	Propriétés enzymatiques des LOX .....	53
4.4.4.	Fonction biologique des LOX .....	54
4.4.5.	Les LOX dans l'inflammation.....	54
4.4.5.1.	Propriétés pro-inflammatoires .....	55
4.4.5.2.	Propriétés anti-inflammatoires .....	55
4.5.	Les oxylipines et la 12-HETE.....	56
4.5.1.	Les oxylipines.....	56
4.5.2.	Les HETE .....	56
4.5.3.	La 12-HETE .....	56
4.5.3.1.	Classification .....	56
4.5.3.2.	Récepteurs du 12-HETE .....	57
4.5.3.3.	Fonction.....	58
5.	Hypothèse de recherche et objectifs.....	59
Chapitre 2 – Méthodologie.....		60
1.	Matériels et réactifs .....	61
2.	Méthodes .....	63
2.1.	Collecte des échantillons en pathologie.....	63
2.2.	Culture cellulaire.....	64
2.2.1.	La dissection des tissus.....	64
2.2.2.	La digestion .....	64
2.2.2.1.	Digestion du cartilage.....	65
2.2.2.2.	Digestion de la membrane synoviale.....	65
2.2.3.	Incubation des cellules.....	65

2.2.4.	Changement du milieu de culture et examen de la confluence .....	66
2.2.4.1.	Le changement de milieu de culture.....	66
2.2.4.2.	L'examen de la confluence.....	66
2.2.5.	Le passage des synoviocytes .....	67
2.2.5.1.	La trypsinisation .....	67
2.2.5.2.	Le comptage et mise en plaque des cellules .....	68
2.2.6.	Les procédés de traitement des cellules.....	69
2.2.6.1.	La privation des cellules .....	69
	Préparation du milieu de privation des cellules .....	69
	Changement de milieu.....	69
	Surveillance du stress cellulaire .....	70
2.2.6.2.	La stimulation des cellules .....	70
	Stimulation dose-dépendante .....	70
	Stimulation temps-dépendante .....	70
2.2.6.3.	Arrêt de la réaction de stimulation .....	70
2.3.	Le test de prolifération cellulaire .....	71
2.3.1.	Configuration de la plaque .....	71
2.3.2.	Traitement des cellules .....	71
2.3.3.	Incubation de la MTT .....	72
2.3.4.	Dissolution des cristaux.....	72
2.3.5.	Lecture de la DO.....	72
2.4.	Le test de migration cellulaire.....	72
2.4.1.	Passage des cellules .....	72
2.4.2.	Privation des cellules .....	73
2.4.3.	Le test de rayure .....	73

2.4.4.	Traitement des cellules et capture d'images.....	73
2.5.	Quantification des protéines .....	73
2.5.1.	Lyse des cellules.....	73
2.5.1.1.	Préparation du tampon de lyse.....	73
2.5.1.2.	Ajout du tampon de lyse dans les cellules.....	74
2.5.2.	Sonication des protéines .....	74
2.5.3.	Dosage des protéines .....	74
2.5.3.1.	La fragmentation de la chromatine.....	75
2.5.3.2.	La purification des protéines .....	75
2.5.4.	La quantification .....	75
2.6.	Western blot.....	76
2.6.1.	La préparation du gel.....	76
2.6.1.1.	Préparation des solutions.....	77
2.6.1.2.	Montage des plaques .....	77
2.6.1.3.	Coulage des gels dans les plaques.....	77
2.6.2.	La migration des protéines .....	78
2.6.2.1.	La préparation des échantillons.....	78
2.6.2.2.	Dépôt des échantillons.....	79
2.6.2.3.	Électrophorèse des protéines .....	79
2.6.3.	Le transfert des protéines.....	80
2.6.3.1.	La préparation du tampon de transfert.....	80
2.6.3.2.	L'incubation des éléments de transfert.....	81
2.6.3.3.	Réalisation du sandwich .....	81
2.6.3.4.	Déroulement du transfert.....	82
2.6.4.	Révélation de l'expression d'anticorps.....	83

2.6.4.1.	Révélation au rouge ponceau.....	83
2.6.4.2.	Révélation à base d'anticorps .....	84
2.6.4.2.1.	Blocage de la membrane.....	84
2.6.4.2.2.	L'incubation à l'anticorps primaire .....	84
2.6.4.2.3.	L'incubation à l'anticorps secondaire.....	84
2.6.4.2.4.	L'ajout du substrat .....	85
2.6.4.3.	La capture des images.....	85
2.7.	Histologie.....	86
2.8.	Immunohistologie .....	87
2.8.1.	Le déparaffinage .....	87
2.8.2.	La réhydratation.....	88
2.8.3.	Le démasquage des antigènes.....	88
2.8.4.	Le blocage des sites non spécifiques .....	89
2.8.5.	L'ajout de l'anticorps primaire .....	90
2.8.6.	L'ajout de l'anticorps secondaire .....	90
2.8.7.	L'application du substrat ABC .....	91
2.8.8.	L'application du chromogène.....	91
2.8.9.	La contre coloration.....	93
2.9.	L'extraction de l'ARN et la PCR en temps réel .....	94
2.9.1.	Extraction de l'ARN.....	94
2.9.2.	La reverse transcriptase PCR.....	94
2.9.3.	La PCR en temps réel .....	95
2.10.	Analyses des données.....	97
Chapitre 3 – Résultats .....		98
1.	Évaluation de l'effet du 12-HETE sur la viabilité cellulaire dans l'OA .....	99
1.1.	Effet du 12-HETE et du contrôle sur la prolifération des chondrocytes.....	99

1.2.	Effet du 12-HETE et du contrôle sur la prolifération des synoviocytes .....	100
1.3.	Effet du 12-HETE et du contrôle sur la migration des chondrocytes .....	101
1.4.	Effet du 12-HETE et du contrôle sur la migration des synoviocytes .....	103
2.	Effet du 12-HETE sur les réponses inflammatoires et cataboliques .....	105
2.1.	Dans les chondrocytes.....	105
2.1.1.	Expression de la protéine COX-2.....	105
2.1.2.	Expression des protéines MMP-1 et MMP-13 .....	107
2.2.	Dans les synoviocytes .....	109
2.2.1.	Expression de la protéine COX-2.....	109
2.2.2.	Expression des protéines MMP-1 .....	111
3.	Représentation histologique de l'OA .....	112
4.	Expression de la GRP 31 dans les tissus articulaires .....	114
4.1.	Expression de GRP 31 dans les chondrocytes et les synoviocytes articulaires arthrosiques humaines. ....	114
4.2.	Expression de la GRP 31 sur les tissus humains dégradés et non dégradés .....	116
4.3.	Expression de la GRP 31 sur les tissus dégradés et non dégradés du chien .....	118
5.	Effet l'IL-1 $\beta$ sur COX-2, iNOS et GRP 31.....	120
5.1.	Au niveau des chondrocytes .....	120
5.2.	Au niveau des synoviocytes.....	121
Chapitre 4 - Discussion .....		122
Chapitre 5 – Conclusion et perspectives .....		130
Références bibliographiques .....		132

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> .....	30
<i>Algorithme de prise en charge pharmacologique.</i> .....	30
<b>Tableau 2</b> .....	32
<i>Algorithme de prise en charge non-pharmacologique.</i> .....	32
<b>Tableau 3</b> .....	52
<i>Gènes ALOX et principaux sites d'expression des isoformes LOX correspondantes</i> .....	52
<b>Tableau 4</b> .....	57
<i>Classification du 12-HETE et la 15-HETE chez la souris et l'humain</i> .....	57
<b>Tableau 5</b> .....	96
<i>Conditions d'amplification</i> .....	96

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> .....	27
<i>Les facteurs de risque de l'OA.</i> ....	27
<b>Figure 2</b> .....	34
<i>Structure du genou humain</i> .....	34
<b>Figure 3</b> .....	36
<i>Organisation structurelle du cartilage</i> .....	36
<b>Figure 4</b> .....	37
<i>Structure de la membrane synoviale</i> .....	37
<b>Figure 5</b> .....	38
<i>Les mécanismes de la pathogenèse de l'OA</i> .....	38
<b>Figure 6</b> .....	41
<i>Mécanisme du stress oxydatif dans l'OA</i> .....	41
<b>Figure 7</b> .....	43
<i>Illustration du processus inflammatoire dans l'OA</i> .....	43
<b>Figure 8</b> .....	46
<i>Cytokines pro-inflammatoires de l'OA.</i> .....	46
<b>Figure 9</b> .....	50
<i>Les voies de synthèses des eicosanoïdes</i> .....	50
<b>Figure 10</b> .....	99
<i>La 12-HETE n'affecte pas la prolifération des chondrocytes</i> .....	99
<b>Figure 11</b> .....	100
<i>La 12-HETE n'affecte pas la prolifération des synoviocytes</i> .....	100
<b>Figure 12</b> .....	101
<i>La 12-HETE n'a pas d'effet sur la migration des chondrocytes</i> .....	101
<b>Figure 13</b> .....	103
<i>La 12-HETE n'a pas d'effet sur la migration des synoviocytes</i> .....	103
<b>Figure 14</b> .....	106
<i>Effet du 12-HETE sur l'expression de la protéine COX2 dans les chondrocytes arthrosiques</i> ...106	
<b>Figure 15</b> .....	107

<i>Effet du 12-HETE sur l'expression des protéines MMP-1 et MMP-13 dans les chondrocytes arthrosiques.</i> .....	107
<b>Figure 16</b> .....	109
<i>Effet du 12-HETE sur l'expression de la COX-2 dans les synoviocytes arthrosiques.</i> .....	109
<b>Figure 17</b> .....	111
<i>Effet du 12-HETE sur l'expression des protéines MMP-1 dans les synoviocytes arthrosiques...</i>	111
<b>Figure 18</b> .....	112
<i>Cartilage humain normal.</i> .....	112
<b>Figure 19</b> .....	113
<i>Cartilage humain OA.</i> .....	113
<b>Figure 20</b> .....	114
<i>Les chondrocytes et les synoviocytes du cartilage humain expriment le GRP31.</i> .....	114
<b>Figure 21</b> .....	116
<i>Expression de la protéine qui code pour le gène GRP31 dans le cartilage normal et arthrosique.</i> .....	116
<b>Figure 22</b> .....	118
<i>Expression de la protéine qui code pour le gène GRP31 dans le cartilage normal et OA.</i> .....	118
<b>Figure 23</b> .....	120
<i>Effet de l'IL-1<math>\beta</math> sur l'expression des protéines COX-2, iNOS et GPR31 dans les chondrocytes OA.</i> .....	120
<b>Figure 24</b> .....	121
<i>Effet de l'IL-1<math>\beta</math> sur l'expression des protéines COX-2 et GPR31 dans les synoviocytes OA.</i> .....	121

## Liste des sigles et abréviations

<b>AA:</b>	Acide Arachidonique
<b>AASAL:</b>	Anti-Arthrosiques Symptomatiques d'Action Lente
<b>ADAMTS:</b>	A-Désintégrine et Métalloprotéinase avec des motifs de Thrombospondine
<b>ADN:</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADNmt:</b>	ADN mitochondrial
<b>AGPI:</b>	Acide Gras Polyinsaturé
<b>AINS:</b>	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
<b>ANOVA:</b>	Analyse de la Variance
<b>APS:</b>	Amonium Persulfate
<b>ARN:</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BLT2:</b>	Récepteur 2 du Leucotriène
<b>CEI:</b>	Cellules de l'Épithélium Intestinal
<b>Col2:</b>	Collagène de type II
<b>COX-2:</b>	Cyclooxygénase 2
<b>DHA:</b>	Acide Docosahexaénoïque
<b>DLA:</b>	Acide Dihomo- $\gamma$ -Linoléique
<b>DMSO:</b>	Diméthyle Sulfoxyde
<b>EET:</b>	Epoxyeicosatetraenoic acid ou acide Epoxyéicosatétraénoïque
<b>EPA:</b>	Acide Eicosapentaénoïque

<b>EpOME</b>	Acide Epoxyoctadécamonoénoïque
<b>EULAR:</b>	European League Against Rheumatism
<b>GAPDH:</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>GMP:</b>	Guanosine Monophosphate
<b>GRP31:</b>	Récepteur 31 couplé à la Protéine G
<b>GS:</b>	Glucosamine
<b>HE:</b>	Huile Essentiel
<b>HETE:</b>	Acide Hydroxyeicosatétraénoïque
<b>HHT</b>	: acide HydroxyHeptadeca-5Z, 8E, 10E-Triénoïque
<b>HODE</b>	Acide Hydroxyoctadecadiénoïque
<b>HRP:</b>	Horseradish Peroxidase
<b>IAS:</b>	Insaponifiables d'Avocat Soja
<b>IGF-1:</b>	Insulin Growth Factor-1
<b>IL:</b>	Interleukine
<b>IMC:</b>	Indice de Masse Corporelle
<b>IR:</b>	Ischémie Reperfusion
<b>KO:</b>	Knockout
<b>LA:</b>	Acide Linoléinique
<b>LOXs:</b>	Lipoxygénases
<b>LTB4:</b>	Récepteur des leucotriènes B4
<b>LX:</b>	Lipoxine

<b>MANKIN</b>	Histologic/histochemical grading system ou Système de classement histologique histochimique pour l'évaluation de la dégénérescence du cartilage
<b>MAPK:</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>MEC:</b>	Matrice Extra-Cellulaire
<b>Mg:</b>	Magnésium
<b>mPGES:</b>	Prostaglandine Synthase E microsomale
<b>NF-KB:</b>	Nuclear Factor-kappa B ou Facteur Nucléaire - Kappa B
<b>NO</b>	Oxyde Nitrique
<b>OA:</b>	Ostéoarthrite ou arthrose
<b>OAD</b>	Ostéo-arthropathie dégénérative
<b>OARSI</b>	Osteoarthritis Research Society International ou Société Internationale de Recherche sur l'Arthrose
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffer Salin ou solution saline tamponnée au phosphate
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne
<b>PEC:</b>	Prise En Charge
<b>pg/ml:</b>	Picogramme par millilitre
<b>PG:</b>	Prostaglandine
<b>PGES:</b>	Prostaglandine Synthase E
<b>PR:</b>	Polyarthrite Rhumatoïde
<b>ROS:</b>	Espèces Réactives Oxygénées
<b>Rv:</b>	Résolvine
<b>SF:</b>	Synoviocyte de type Fibroblaste ou Synoviocyte fibroblastique
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA ou ARN interférent ou ARN silencieux

<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription ou Transducteur de signal et activateur de transcription
<b>TEMED:</b>	Tetraacetylenediamine
<b>TENS:</b>	Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation ou Stimulation nerveuse électrique transcutanée
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Transforming Growth Factor- $\beta$ ou Facteur de croissance transformant- $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ou Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
<b>tr/min:</b>	Tour par minute
<b>TX:</b>	Thromboxane
<b>TXA2:</b>	Thromboxane A2
<b>USB:</b>	Universal Serial Bus ou norme de bus informatique en série

*A mes parents M. et Mme Dassi*

## Remerciements

Je remercie Dr George Szatmari, directeur du programme de Microbiologie, Immunologie et Infectiologie, pour son soutien et sa disponibilité.

Je remercie mon directeur de recherche, Dr. Hassan Fahmi, pour m'avoir donné l'opportunité de préparer ma maîtrise dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissant pour sa patience, ses encouragements, ses conseils et surtout pour la formation dont j'ai été gratifié.

Je remercie ma codirectrice, Dre Johanne Martel-Pelletier et le Dr Jean-Pierre Pelletier, de m'avoir reçu dans l'Unité de Recherche sur l'arthrose où j'ai pu réaliser mes travaux.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'Unité de Recherche sur l'arthrose, plus particulièrement Dr Hassan Afif, pour l'ensemble des techniques apprises dans la réalisation de mon projet.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de mes collaborateurs de laboratoire, Sami Alsabri, Frédéric Paré, Mohamed Farès, Ahmed Afailal-Tribak et Yassine Ouhaddi pour leur conseil, leur expertise et leur soutien.

Je remercie tous mes proches spécialement les grandes familles Kamdem Ambroise, Dassi Christoph et Kouam Jean-Pierre qui m'ont soutenues et encouragées durant tout ce cheminement. Je remercie celles et ceux qui, d'une manière directe ou d'une autre, ont participé à la réalisation de ce mémoire de maîtrise.

## **Chapitre 1 – Introduction**

# **1. Présentation de l'arthrose**

## **1.1. Définition de l'arthrite**

Le mot arthrite, constitué de deux racines 'arthro' et 'itis' qui signifient respectivement articulation et inflammation, est un terme qui regroupe un ensemble de plusieurs maladies qui se définissent par une inflammation des articulations et d'autres parties du corps (Société de l'arthrite du Canada, 2023). L'arthrite est aussi reconnue comme étant une inflammation de l'articulation synoviale à la suite de la dégradation du cartilage (Juneja et al., 2023).

On compte plus de 100 formes différentes d'arthrite recensées principalement chez l'homme dont certains sont aussi présents chez les enfants. L'arthrite est particulièrement fréquente dans le genou où elle est une cause majeure de perte de temps au travail et une invalidité grave pour de nombreuses personnes. Les principaux types d'arthrite qui affectent le genou sont la polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite post-traumatique et l'arthrose (AAOS, 2023).

## **1.2. Définition de l'arthrose**

L'arthrose ou l'ostéoarthrite (OA) se définit comme étant un remodelage anormal des tissus articulaires sous l'effet d'une multitude de métabolites inflammatoires dans l'articulation concernée (Loeser et al., 2012). C'est une forme d'arthrite qualifiée d'un des troubles rhumatismaux la plus courante et l'une des principales causes d'invalidité de longue durée (Habouri et al., 2017). L'OA est non seulement une maladie avec des modifications pathologiques dans les tissus articulaires, mais aussi, une affection, caractérisée par des douleurs articulaires et des handicaps fonctionnels (Hawker & King, 2022).

## **1.3. Historique de l'OA**

Longtemps considérées dans les siècles passés comme l'une des complications liées à la vieillesse, la raideur et la douleur dans les articulations étaient considérés comme des signes de mortalité. Le nom d'arthrite fut attribué à ces manifestations au 16<sup>e</sup> siècle avec l'avancement des connaissances sur l'anatomie des articulations. Au cours du 19<sup>e</sup> siècle, deux paradigmes de la maladie ont vu le jour, à savoir la polyarthrite rhumatoïde en tant que forme d'inflammation chronique et de l'OA en tant que conséquence de l'usure physique. Au 20<sup>e</sup> siècle, les facteurs associés à l'OA ont été élucidés et dès 1930 les premiers actes chirurgicaux liés à la maladie ont été posés. Dans les

années 1960, les avancements sur les pratiques thérapeutiques contre la maladie ont rendu possible l'usage des prothèses au niveau des articulations et des analgésiques contre la douleur. Au cours des 40 dernières années, les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont été plus largement utilisés. De nos jours, il est devenu clair que l'OA n'est pas simplement une question de dommages mécaniques. C'est ainsi que de nombreux autres facteurs de risque, étiologique et de nouvelles hypothèses de la pathogenèse ont été identifiés, et les chercheurs ont élucidé les voies chimiques associées à l'inflammation et à l'usure (Barnett, 2018).

## **1.4. Épidémiologie de l'OA**

### **1.4.1. Prévalence et incidence de l'OA dans le monde**

Des études statistiques récentes sur l'épidémiologie de l'OA révèlent qu'environ 240 millions de personnes dans le monde sont affectées par l'OA avec une prévalence de 10 % chez les hommes et 18 % chez les femmes âgées de 60 ans et plus (Allen et al., 2022).

La prévalence de l'OA est fonction de la définition qu'on se donne d'elle. Du point de vue clinique, il est relevé que l'OA du genou est la forme la plus courante suivie de celle de la main et de la hanche. De plus, l'OA du genou est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019).

Le nombre de cas d'OA du genou est en constante évolution dans le monde, sa prévalence ayant augmenté d'environ 113 % entre 1990 et 2019. Cette croissance pourrait être due au fait que les personnes âgées ne sont pas les seules à être touchées par cette maladie, mais aussi, les plus jeunes. Ainsi souligne un rapport qui indique que plus de 8 millions de patients souffrant d'OA du genou aux États-Unis sont âgés de moins de 65 ans, dont 2 millions de moins de 45 ans (Martel-Pelletier et al., 2023).

Dans la région du Moyen-Orient et de l'Afrique, subsaharienne par exemple, la prévalence de l'OA du genou est passée de 6,16 millions à 17,75 millions de cas, entre 1990 et 2019, avec un nombre de cas incidents estimé à 1,69 million (Shamekh et al., 2022). La tendance était d'autant plus élevée chez les femmes qui sont passées de 3,94 % en 1990 à 4,44 % en 2019, que chez les hommes qui sont passés de 3,24 % en 1990 à 3,66 % en 2019 (Hoveidaei et al., 2023).

#### 1.4.2. Au Canada

Le diagnostic de l'OA a été posé chez 13,6 % des personnes âgées de plus de 20 ans (Cordingley & Cornish, 2022). Selon la Société de l'arthrite du Canada, plus de 4 millions de Canadiens souffrent d'OA, dont environ 1 adulte canadien sur 7. Ce taux varie en fonction de l'âge et du sexe, avec une tendance plus élevée chez les femmes (16,1 %) que chez les hommes (11,1 %) (Santé Canada, 2020).

#### 1.4.3. Au Québec

On dénombre 10,5 % de personnes âgées de 15 ans et plus ayant reçu un diagnostic d'arthrite ou d'OA. Cette proportion augmente de manière importante avec l'âge. Elle est au moins 2 fois plus importante dans le groupe d'âge de 65 ans et plus que le groupe de 45 à 64 ans (Santé Québec, 2022).

### 1.5. Les facteurs de risque

L'OA a été longtemps considérée comme un effet du vieillissement. De nos jours, la pathogenèse est multifactorielle et intègre des traits constitutifs de l'articulation, des facteurs de risque non-modifiables et modifiables (Bortoluzzi et al., 2018).

#### 1.5.1. Les facteurs non-modifiables

Encore appelées facteurs systémiques, elles regroupent l'âge, le sexe et les facteurs génétiques ou ethniques (Figure 1). L'âge est plus important indépendamment l'articulation touchée ; le sexe permet de constater que les femmes sont plus atteintes par l'OA que les hommes surtout après la ménopause ; et les facteurs génétiques ou ethniques interviennent avec la sévérité de l'OA (Marhadour et al., 2012). Le sexe devrait avoir une attention assez poussée, du fait que la capacité à produire les eicosanoïdes impliqués dans la synthèse des leucotriènes (LTs) qui concourent à la défense contre l'inflammation, n'est pas identique chez les femmes et les hommes et pourrait être à l'origine de la disparité de l'OA entre les deux groupes (Pace et al., 2017).

#### 1.5.2. Les facteurs modifiables

Les facteurs de risques modifiables ou locaux ou environnementaux regroupent les faits qui révèlent de la qualité de vie des personnes souffrant d'OA (Marhadour et al., 2012). Les quatre principaux facteurs environnementaux dans la pathogenèse de l'OA, devenus incontournables au

cours des cinquante dernières années sont l'obésité, le syndrome métabolique, les changements alimentaires et l'inactivité physique (Figure 1) (Berenbaum et al., 2018).

L'obésité renforce le risque d'OA dans les articulations portantes et non-portantes, il augmente de deux fois le risque d'OA symptomatique au cours de la vie par rapport aux personnes dont l'IMC est en dessous de 25 % (Nedunchezhiyan et al., 2022).

Le syndrome métabolique contribue à l'incidence et à la prévalence de l'OA, en ce sens que c'est un prédicteur important des profils de la douleur chez les personnes présentant des douleurs au niveau du genou (Valdes, 2020).

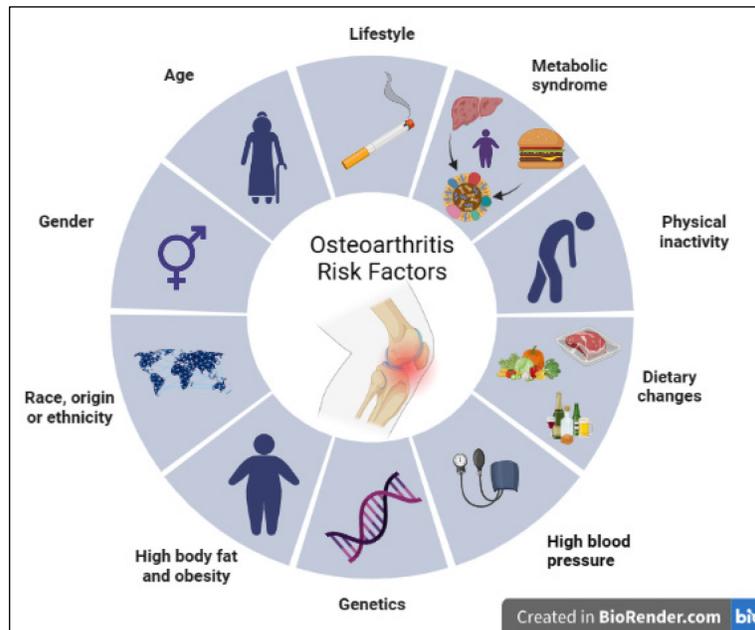
Dans le changement alimentaire, de faibles apports en éléments nutritifs comme les vitamines (D, C, E, K et Mg) peuvent contribuer à la progression de l'OA, mais, des habitudes alimentaires, plus saines et contrôlées peuvent aider à ralentir la progression de la maladie (Zeng et al., 2023).

L'inactivité physique contribue largement à l'OA symptomatique, elle est impliquée dans la hausse de la prévalence de l'OA du genou en favorisant le surpoids et l'accumulation de tissu adipeux. Il a été démontré que la statique prolongée des membres au repos favorise un cartilage articulaire plus mince avec une teneur en agrécane plus faible, ainsi qu'à une diminution de la rigidité du cartilage (Wallace et al., 2019).

Une étude suggère que plusieurs groupes de gènes peuvent augmenter le risque de développer une arthrose, notamment : les gènes de structure de la matrice extracellulaire du cartilage : Les variations des gènes COL2A1 (collagénase de type II, alpha 1) peuvent réduire la durabilité du cartilage contre le stress dans la hanche et les articulations; les gènes de la densité osseuse : Les variations des gènes des récepteurs d'œstrogènes peuvent augmenter le risque de développer une arthrose. En outre, les variations des gènes des récepteurs de la vitamine D peuvent augmenter le risque d'arthrose de la main et du genou; les gènes de signalisation cellulaire des chondrocytes : Les variations du gène FRZB (Frizzled Related Protein ou Protéine apparentée à la protéine Frizzled) peuvent entraîner une augmentation du risque d'arthrose chez les femmes et les gènes des cytokines inflammatoires : Les variations des gènes IL-1R1 (récepteur de l'interleukine 1, de type I) peuvent augmenter le risque d'arthrose de la main (Yucesoy et al., 2015).

**Figure 1**

*Les facteurs de risque de l'OA.*



*Note.* Adapté de “Facteurs de risques du cancer colorectal”, par Dassi, H. (2023) BioRender. Extrait de <https://app.biorender.com/profile/Mba.Habib/templates/6492b69c186975aa2a091dfe>

## 1.6. Symptômes de l'OA

On distingue deux grands types à savoir les symptômes dus à un processus inflammatoire qui s'est installé et les symptômes dus à un stress mécanique qui s'est opéré dans l'articulation concernée.

Parmi les symptômes pro-inflammatoires de l'OA, on retrouve la douleur dont l'origine est partagée entre les altérations de la matrice cartilagineuse conduisant à des épisodes d'inflammation et sa modulation par le cerveau et la moelle épinière ; la raideur ou la perte de fonction associée à la fibrose capsulaire, la contracture des tendons, l'atrophie musculaire, l'inhibition musculaire et la diminution de la condition physique. Par ailleurs, la raideur matinale prolongée, l'inactivité, les signes de chaleur, d'épanchement et de souffrance dus au stress sont des précurseurs à une phase inflammatoire de la maladie. Enfin, nous avons la réaction du patient, car elle peut être aussi importante que les lésions structurelles pour déterminer le degré d'invalidité et de douleur ressentie par le patient (Jones & Doherty, 1992).

Pendant les crises de l'OA on assiste aussi à des douleurs mécaniques diminuant au repos et une impotence fonctionnelle très variable. L'état général est toujours bien conservé. L'examen clinique recherche une limitation des mouvements, une déformation et un épanchement. Les épanchements sont de type mécanique avec un liquide articulaire visqueux, transparent et de couleur jaune clair. On a aussi des symptômes résultant de facteurs biomécaniques défavorables comme l'obésité, le désalignement et l'instabilité (Jones & Doherty, 1992; Railhac et al., 2009).

### **1.7. Diagnostic de l'OA**

Les moyens d'exploration de l'OA sont divers et reposent essentiellement sur des techniques d'imagerie. La radiologie conventionnelle renseigne sur la présence des signes d'OA ou de pré-OA ; la présence des facteurs étiologiques d'OA ; et la présence d'éventuelles complications d'OA. L'échographie est utile dans l'étude des parties molles des membres et dans les cas d'articulations profondes peu accessibles à la palpation. La tomодensitométrie communément appelée « scanner » apporte une lecture tridimensionnelle ou la 3e dimension dans l'étude des articulations, sous la forme de vues axiales impossibles à obtenir par des techniques conventionnelles. Cependant, il ne permet pas une lecture satisfaisante des cartilages, mais il précise fort bien les contours des disques intervertébraux, la présence d'air ou de calcifications et surtout renseigne sur l'état de l'os sous-chondral et les rapports articulaires. L'arthrographie est la vraie radiographie de l'articulation, elle renseigne sur l'état des principaux constituants (chambre articulaire, membrane synoviale, cartilage d'encroûtement, fibrocartilages) en moulant des structures non spontanément visibles en radiographie (Railhac et al., 2009). De nos jours, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) figure comme étant une méthode incontournable pour le diagnostic de l'OA, en effet, l'IRM offre une excellente visualisation anatomique des tissus mous et permet de visualiser toutes les structures d'une articulation : cartilage, synoviale, ligaments, ménisques, et os sous-chondral (Pers & Breton, 2021).

## **1.8. Traitement de l'OA**

Les objectifs thérapeutiques sont de soulager la douleur, motif habituel de la consultation, faire rétrocéder une éventuelle poussée congestive et enfin traiter la maladie, c'est-à-dire tenter de ralentir sa progression (Conrozier & Flipo, 2003).

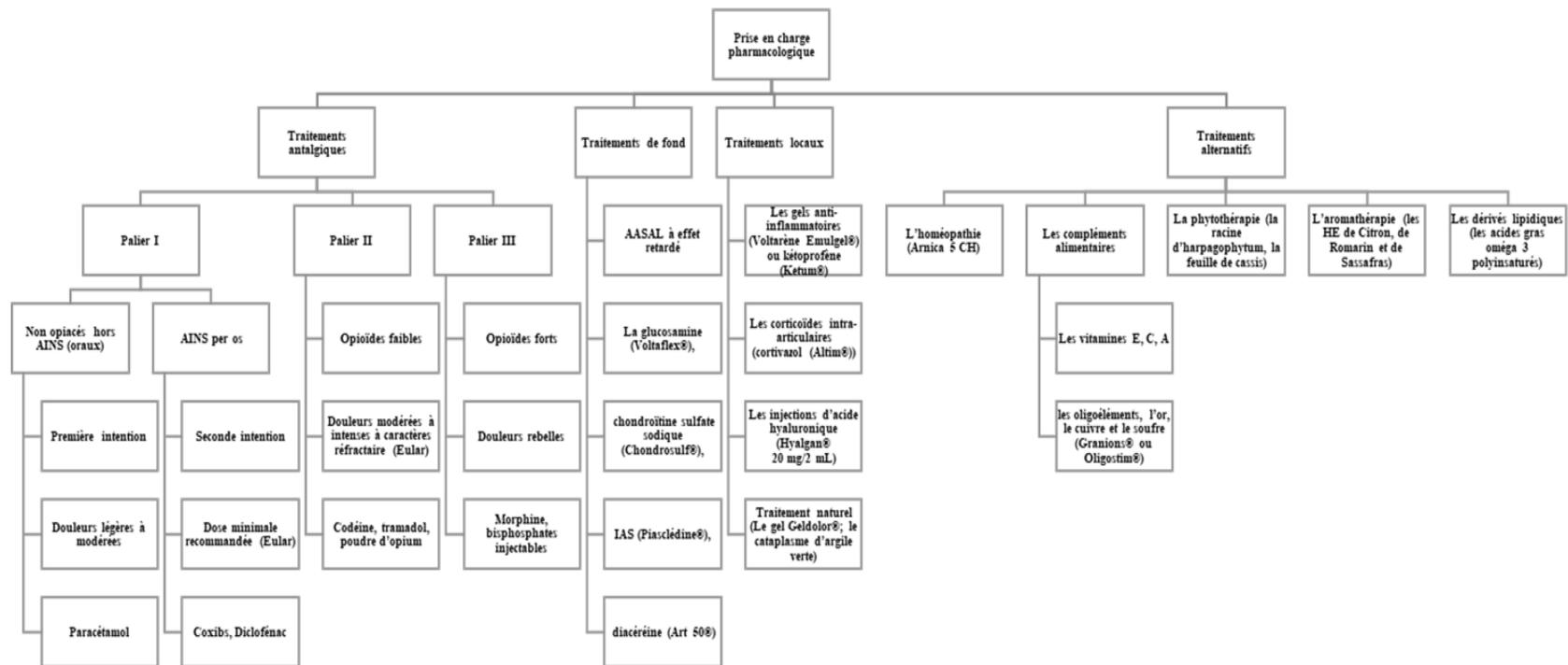
Dans le traitement de l'OA, on retrouve deux types de prise en charge (PEC) à savoir pharmacologique et non- pharmaceutique : chaque type de PEC emploie différentes approches qui parfois se complètent ou vont ensemble.

### **1.8.1. La PEC pharmacologique**

Les traitements antalgiques ont pour objectif de soulager les douleurs causées par l'OA, mais aussi de préserver les mobilités et de restaurer la qualité de vie (Tableau 1). Les traitements de fonds permettent une diminution de la prise d'antalgiques au long cours, notamment des Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Lagorce et al., 2016). Les traitements locaux sont utilisés généralement comme traitement d'appoint des douleurs articulaires mineures. (Conrozier & Flipo, 2003). Les traitements alternatifs sont indiqués pour calmer leurs douleurs arthrosiques (Lagorce et al., 2016)

**Tableau 1**

*Algorithme de prise en charge pharmacologique.*



*Note.* Adapté de (Lagorce et al., 2016)

### 1.8.2. La PEC non-pharmacologique

Certains patients arthrosiques choisissent souvent, en complément des thérapeutiques médicamenteuses, des traitements non pharmacologiques, locaux ou fonctionnels. Les traitements locaux sont utilisés pour soulager les sensations douloureuses. Les traitements fonctionnels antidouleur sont des interventions qui concourent à la lutte contre les manifestations douloureuses, l'entretien de la mobilité articulaire, l'entretien musculaire, la prévention des attitudes vicieuses et l'économie articulaire au travers d'une rééducation des patients. Ces séances doivent être associées au traitement médical. On note ici que les traitements chirurgicaux ne doivent être envisagés qu'en dernier recours, devant une douleur non soulagée par la thérapeutique mise en place ainsi que la non-amélioration de la mobilité (Lagorce et al., 2016) (Tableau 2).

### 1.8.3. Les traitements et cibles thérapeutiques d'avenir

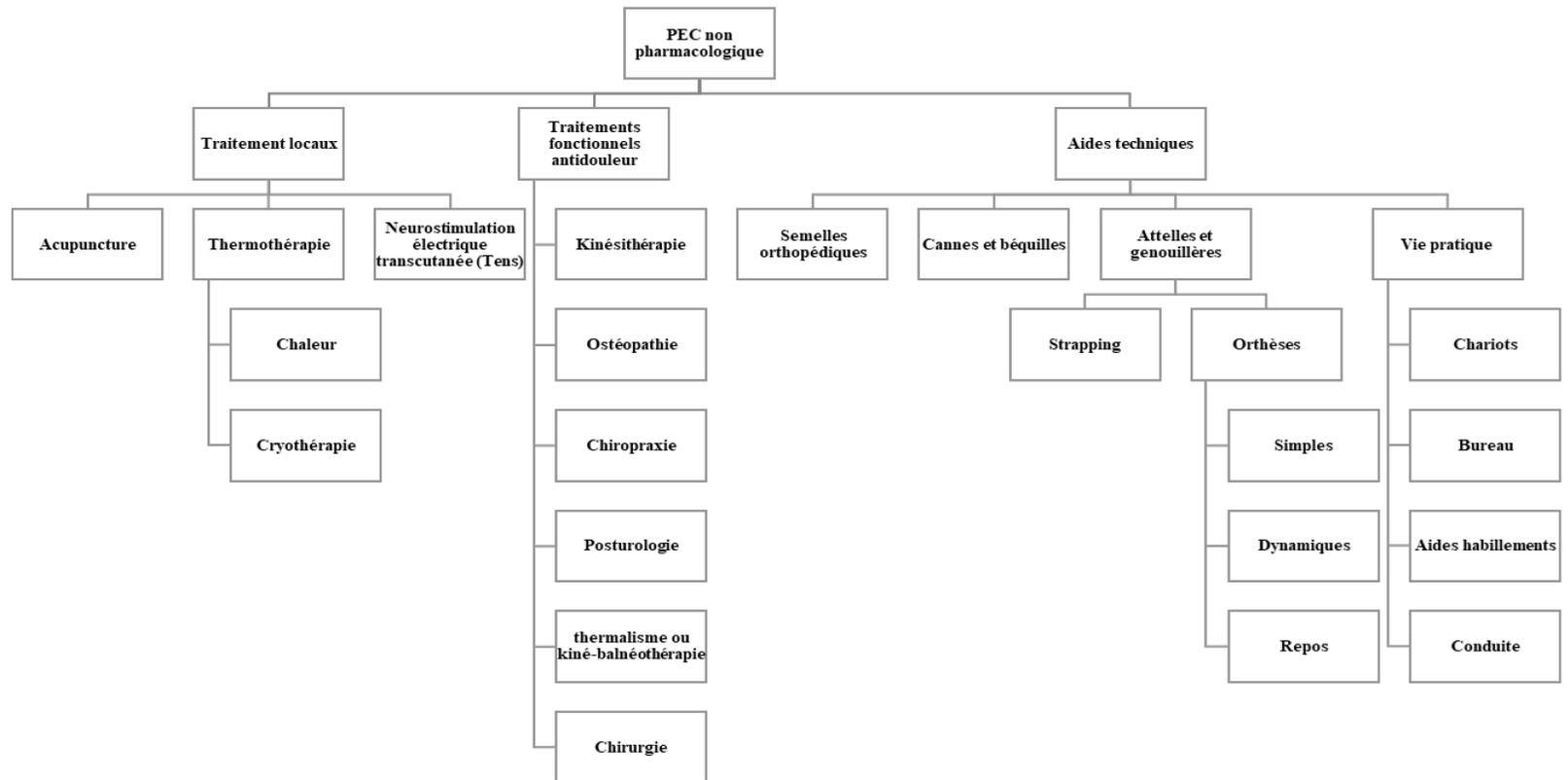
Il s'agit des approches thérapeutiques novatrices pour rendre plus adapté, précis et efficace le traitement contre l'OA afin d'obtenir une médecine plus personnalisée, basée sur l'identification de cibles thérapeutiques spécifiques (Delplace et al., 2021). Nous pouvons citer la thérapie cellulaire pour favoriser la prolifération et la différenciation ; le ciblage de l'inflammation synoviale pour le développement de nouveaux traitements personnalisés (Gaignard et al., 2023); l'épigénétique pour permettre la régénération du cartilage et atténuer la dégénérescence articulaire (Ball et al., 2022) et le métabolisme pour prévenir la progression de l'OA en réduisant la réponse immunitaire et en favorisant l'homéostasie cartilagineuse (Delplace et al., 2021).

## **1.9. Prévention de l'OA**

Étant donné que l'obésité engendrée en partie par le manque d'activité fait partir des causes de cette maladie, il serait plus utile d'encourager la pratique des exercices et du sport de façon continue et modérée en tenant compte du niveau d'activité de chaque individu (Valderrabano & Steiger, 2011). D'une manière générale, la prévention de l'OA passe par l'adoption d'une qualité de vie saine. En outre, des études sont actuellement menées pour bien comprendre la physiopathologie de l'OA afin de déceler des méthodes mieux adaptées pour la prévenir (Motta et al., 2023).

**Tableau 2**

*Algorithme de prise en charge non-pharmacologique.*



*Note.* Adapté de (Lagorce et al., 2016)

## **2. Anatomie et tissus composant le genou**

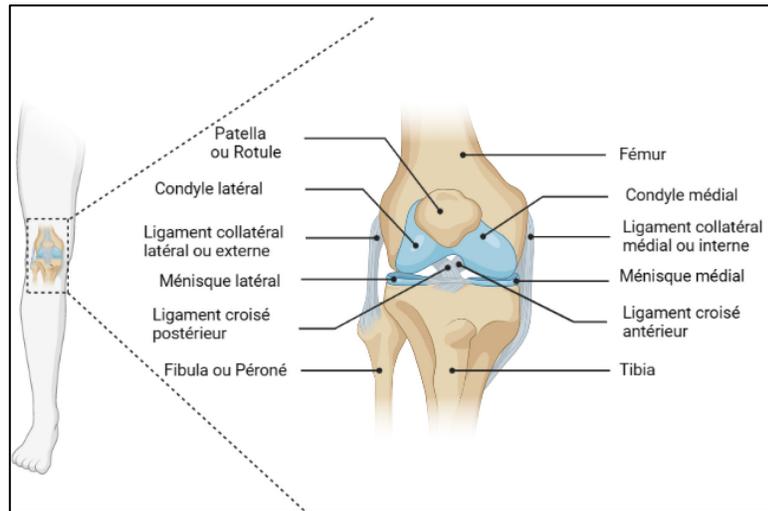
Pour mieux comprendre les dysfonctionnements physiologiques engendrés par l'OA, nous allons nous focaliser sur le genou. En effet, le genou est reconnu comme la plus grande articulation, la plus utilisée et la plus stressée (Mora et al., 2018). L'OA du genou est la maladie chronique musculosquelettique la plus répandue, caractérisée par une défaillance progressive de l'articulation. Elle se manifeste par des douleurs et une invalidité progressive et implique la dégradation et la perte des tissus articulaires (Martel-Pelletier & Pelletier, 2022; Moravek et al., 2023).

### **2.1. Structure du genou**

La structure externe révèle trois principales organisations : une structure osseuse qui comprend quatre os (Figure 2): fémur distal, tibia proximal, rotule et le péroné ; une structure du cartilage où on retrouve deux types de cartilage : le ménisque du genou et le cartilage libre ou articulaire et une structure ligamentaire (Mora et al., 2018). Cette structure, quant à elle, est constituée de deux ensembles : les ligaments croisés et les ligaments collatéraux. Les ligaments croisés sont subdivisés en deux catégories, les ligaments croisés antérieurs (LCA) et les ligaments croisés postérieurs (LCP). Tandis que dans les ligaments collatéraux, on retrouve les ligaments collatéraux latéraux (LCL) et les ligaments collatéraux médiaux (LCM). L'anatomie interne du genou comprend le coussinet infrapatellaire et la synoviale (Christoforakis et al., 2022; Jang et al., 2021).

**Figure 2**

*Structure du genou humain*



*Note.* Adapté de "articulation du genou", par Dassi. H (2023). Extrait de <https://app.biorender.com/profile/Mba.Habib/templates/6433bb0f55a32d10d245d63e>

Cependant, les structures de l'articulation, fortement impliquées dans la maladie de l'OA, par leur fonction et leur localisation dans l'articulation, sont le cartilage et de la membrane synoviale (Chou et al., 2020).

### 2.1.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif dense bien particulier constitué de chondrocytes et d'une matrice extracellulaire (MEC) dont les constituants majeurs sont les collagènes de type II et les protéoglycanes tels que l'agrécan (Fujii et al., 2022). Le cartilage est formé entre autres de quatre couches (une superficielle, une transitionnelle, une profonde et une calcifiée) ; du tidemark-une ligne qui délimite la couche profonde (riche en chondrocyte) de la couche calcifiée (pauvre en chondrocyte) ; de l'os sous-chondral et l'os spongieux (Figure 3). Il est non-vascularisé et non vascularisé, il se nourrit par adsorption du liquide synovial sécrétée par la membrane synoviale et par l'os sous-chondral (Jiang & Tuan, 2015). Les concentrations d'oxygène dans le cartilage

articulaire varient entre 0,5 et 10 %, avec 6 % d'oxygène dans la couche superficielle et moins de 1 % d'oxygène dans la couche profonde de la zone cartilagineuse (Mohd Yunus et al., 2022).

#### 2.1.1.1. *Les chondrocytes*

Les chondrocytes du cartilage articulaire assurent la régulation de l'homéostasie du cartilage en partie en synthétisant une MEC riche en collagène de type II (Col2), en protéoglycanes et en macromolécules connexes (Fujii et al., 2022).

#### 2.1.1.2. *La MEC*

La MEC du cartilage est principalement constituée de protéoglycanes, dont le protéoglycane majeur, l'agrécane, et d'autres protéoglycanes mineurs (décorine, fibronectine, lumican, biglycan, etc.), et de collagènes, tels que le collagène fibrillaire de type II et d'autres collagènes mineurs (collagènes de type IX, XI et VI) (Mehana et al., 2019). Dans cet assemblage, le collagène et l'élastine font partie des protéines structurelles, la fibronectine et la laminine se retrouvent dans les protéines d'adhésion, alors que les protéases sont essentiellement des Métalloprotéinases (MMP) (Cabral-Pacheco et al., 2020).

#### 2.1.1.3. *Les fibres collagènes du type II*

Le Col2 est un marqueur du chondrocyte normal, sans être totalement spécifique du cartilage articulaire adulte, il représente 95 % des collagènes du cartilage. Il comprend deux formes, la forme IIA, la plus longue, exprimée par les chondrocytes au cours du développement et la forme IIB, dépourvue de l'exon II, exprimée dans le cartilage adulte. Le collagène IIA est réexprimé par les chondrocytes arthrosiques. Le réseau fibrillaire tridimensionnel formé par l'assemblage des molécules de collagène II entre elles confère au cartilage ses propriétés de résistance à la compression et est essentiel pour le maintien de la forme et du volume cartilagineux (Chevalier & Richette, 2005).

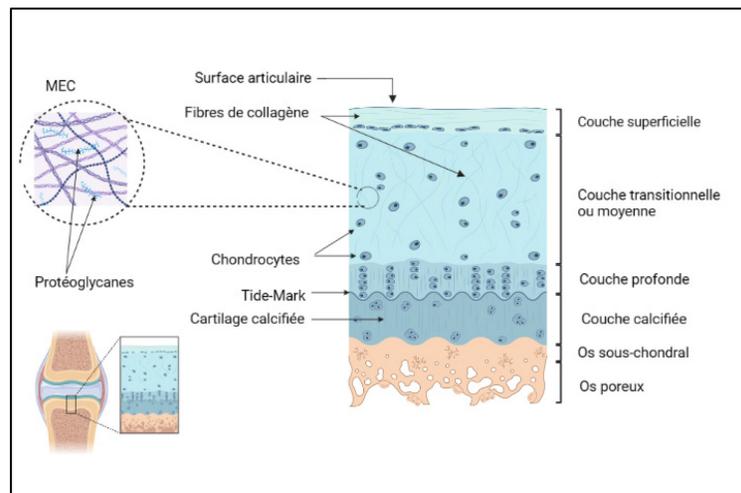
#### 2.1.1.4. *Les protéoglycanes*

Le cartilage articulaire contient deux types de protéoglycanes en fonction de leur capacité d'agrégation à l'acide hyaluronique : les macroprotéoglycanes, majoritairement représentés par l'agrécane et les protéoglycanes qui ont une petite masse molaire : la décorine, le biglycane, la fibromoduline. Les agrécanes sont protéoglycanes ayant une protéine axiale (*core protein*) liée de manière covalente à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG). Ils représentent

environ 90 % des protéoglycanes du cartilage. La grande taille des agrégats de protéoglycanes assure leur maintien au sein des fibres de collagène II. Les GAG, du fait de leur propriétés biophysiques assurent l'hydratation du cartilage et mettant en tension le réseau collagénique, participant ainsi aux propriétés biomécaniques du cartilage (Chevalier & Richette, 2005).

### Figure 3

#### *Organisation structurelle du cartilage*



*Note.* Adapté d'« *Interface Ostéochondral* », par dassi. H. (2023). Extrait de. <https://app.biorender.com/profile/Mba.Habib/templates/64629f253a41cfba59e4fed4>

#### 2.1.2. La membrane et le liquide synovial

##### 2.1.2.1. *La membrane synoviale*

La synoviale est un tissu mou qui se trouve dans les articulations diarthrodiales, les gaines des tendons et les bourses (Nedunchezhiyan et al., 2022). À l'état normal, la couche synoviale comporte une épaisseur de 20 à 40  $\mu\text{m}$  et se compose de plusieurs couches de cellules, la couche interne appelée intima et la couche externe appelée subintima. L'intima est principalement constituée de synoviocytes de type macrophage (type A) (SM) et de synoviocytes de type fibroblaste (type B) (SF), alors que la subintima ou encore couche sous-jacente qui contient du tissu conjonctif fibreux, renferme hormis les vaisseaux sanguins, les lymphocytes (B et T), les mastocytes et les adipocytes, des populations hétérogènes de macrophages et de fibroblastes

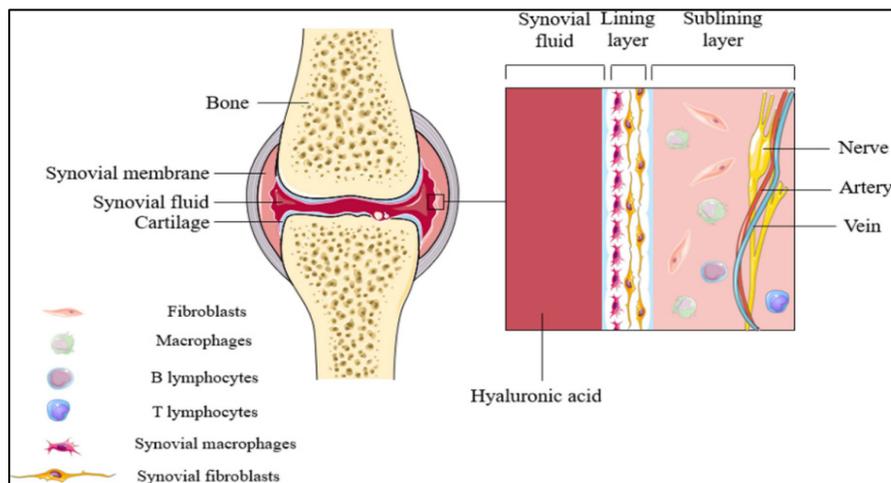
interstitiels, peut atteindre 5 mm d'épaisseur (Knab et al., 2022; Mustonen et al., 2023; Nedunchezhiyan et al., 2022) (Figure 4).

Les SF produisent la MEC qui soutient les structures synoviales et sécrètent de l'acide hyaluronique et de la lubricine afin de maintenir la fonctionnalité du liquide synovial. Toutefois, contrairement aux SF, les SM étendent leurs pseudopodes dans l'espace synovial afin de maintenir l'homéostasie intra-articulaire (Bai et al., 2022).

La membrane synoviale a donc des fonctions mécaniques, mais aussi, de défense contre les infections et l'inflammation. L'un des rôles essentiels du tissu synovial est d'assurer le bon fonctionnement articulaire et cela passe par le contrôle et la régulation de la composition du liquide synovial (LS) contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie cartilagineuse (Knab et al., 2022).

#### Figure 4

##### *Structure de la membrane synoviale*



*Note.* Tiré de « Synovial Macrophages : Past Life, Current Situation, and Application in Inflammatory Arthritis », par Bai, L., 2022, Systematic Review. *Frontiers in Immunology*, 13. (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.905356>)

### 2.1.2.2. Le liquide synovial

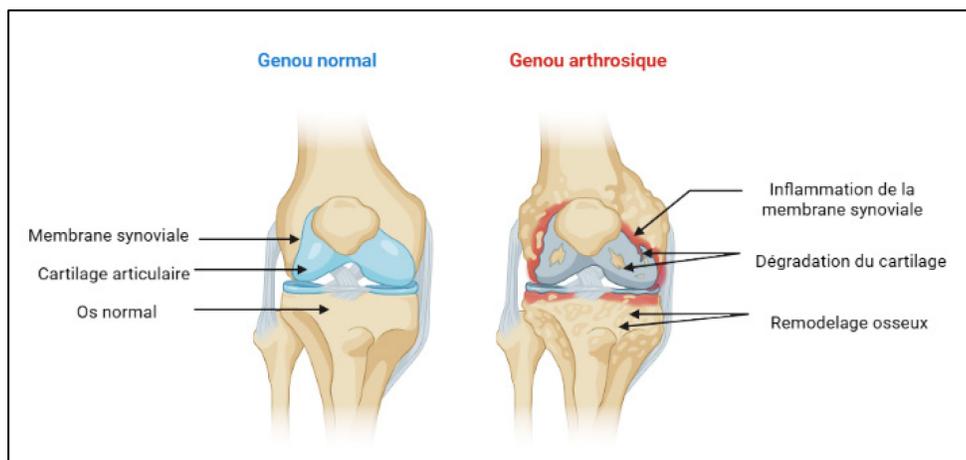
En cas d'agression, le plus souvent la membrane synoviale s'épaissit et sécrète un excès de liquide synovial, c'est le fameux épanchement de synovie. Il existe des maladies spécifiques de ce tissu, la plupart bénignes, les synovites (Knab et al., 2022). Il existe des maladies spécifiques de ce tissu, la plupart bénignes, les synovites (Knab et al., 2022). Les SF produisent des composants du LS qui lubrifient les surfaces du cartilage articulaire. Le LS assure également la nutrition des chondrocytes, tandis que les macrophages protègent contre les infections bactériennes et éliminent les débris (Mustonen et al., 2023).

## 2.2. Les mécanismes pathologiques de l'OA

Une articulation normale ou saine est constituée principalement du cartilage, la synoviale, l'os sous-chondral, les ligaments et la moelle osseuse. Dans l'articulation arthrosique on observe en majeure partie la dégradation du cartilage, l'inflammation de la membrane synoviale qui augmente de volume avec la sécrétion du liquide synovial, la formation d'ostéophyte, un remodelage de l'os sous-chondral et une néovascularisation (Jang et al., 2021) (Figure 5).

### Figure 5

*Les mécanismes de la pathogenèse de l'OA*



*Note.* Adapté de " *Articulation du genou & arthrose du genou* ", par dassi. H. (2023). Extrait de <https://app.biorender.com/profile/Mba.Habib/templates/64712092e7c3c38373f295a4>

### 2.2.1. La dégradation du cartilage

Dans un cartilage sain, la synthèse anabolique des composants de la MEC est équilibrée par leur renouvellement catabolique afin de maintenir l'homéostasie de l'articulation. Dans l'OA, les modifications de l'environnement mécanique de l'articulation (par exemple, à la suite d'une blessure ou du vieillissement) modifient cet équilibre en faveur de la dégradation, la dégradation du Col2 et de l'agrécan par les métalloprotéinases entraînant des lésions progressives de l'articulation. L'expression de plusieurs de ces métalloprotéinases, ainsi que de médiateurs pro-inflammatoires, est induite par la déstabilisation mécanique de l'articulation (Farrán et al., 2018; McClurg et al., 2021).

#### 2.2.1.1. Les métalloprotéinases

Les MMP sont des endopeptidases zinc-dépendantes, également appelées matrixines, capables de réguler la composition de la matrice cellulaire et désignées comme les principales protéases responsables de la dégradation de la MEC (Mehana et al., 2019). Les MMP peuvent dégrader tous les types de protéines appartenant à la MEC, et sont également impliqués dans le clivage des récepteurs de la surface cellulaire. Les MMP jouent un rôle majeur dans les processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la différenciation, l'apoptose et la protection de l'hôte et ils régulent les processus inflammatoires normaux et pathologiques. En fonction de leur distribution subcellulaire et de leur spécificité pour les composants de la MEC, les MMP sont divisées en métalloprotéases matricielles de type membranaire (MT-MMP), collagénases, gélatinases, stromélysines et matrilysines (Cabral-Pacheco et al., 2020).

La MMP-13 est considérée comme la plus importante des collagénases les plus classiques (MMP-1, MMP-8) pour la dégradation du collagène dans le cartilage à cause de sa forte affinité pour la digestion du Col2 (Mehana et al., 2019).

#### 2.2.1.1.1. *Les ADAMTS*

La métalloprotéinase ADAMTS est une endopeptidase à zinc de type sécrétoire, comprenant 19 types d'endopeptidases à zinc. L'ADAMTS a été impliquée dans plusieurs maladies humaines, dont l'OA. Les aggrecanases comme ADAMTS-4 et ADAMTS-5, participent au clivage de l'aggrecane dans la MEC (Li et al., 2022).

D'autres facteurs, comme la sénescence des chondrocytes, le stress oxydatif et/ou l'inflammation, peuvent également augmenter l'expression des métalloprotéinases et faire pencher la balance vers la dégradation du cartilage (McClurg et al., 2021).

### 2.2.2. Le stress oxydatif

#### 2.2.2.1. *Production des radicaux libres*

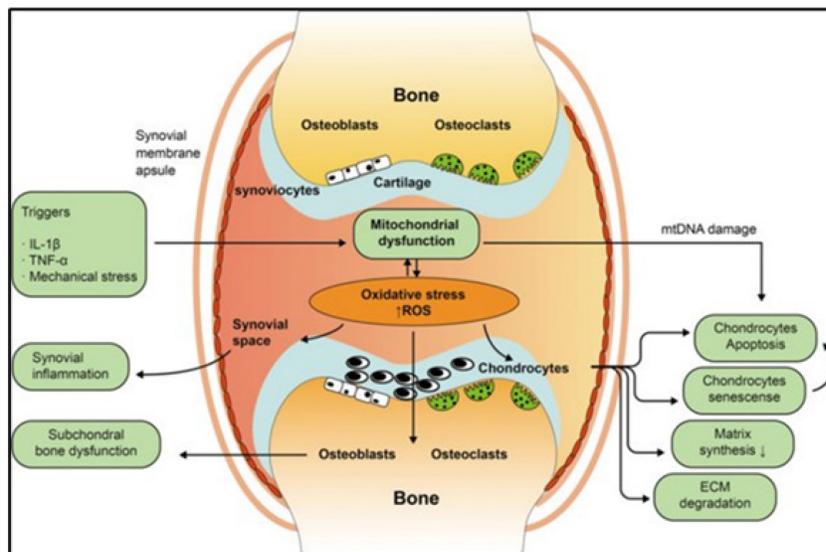
Au cours de l'OA, divers stimuli externes, tels que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le stress mécanique, peuvent provoquer un déséquilibre de la fonction mitochondriale de diverses cellules de la cavité articulaire du genou (He et al., 2020). En effet, ce déséquilibre va entraîner la production de radicaux libres (ROS et NO), de médiateurs lipidiques comme prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et de MMPs au niveau des chondrocytes. Dans le cartilage, l'accumulation de médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial va conduire à une augmentation de l'activité des chondrocytes et à une surproduction de ROS qui entraîne des dommages à l'acide désoxyribonucléique mitochondrial (ADNmt) et réduit la capacité de réparation de l'ADNmt, et entraîne des réponses cataboliques intrinsèques dans les chondrocytes, provoquant finalement un déséquilibre entre la réparation et la destruction du cartilage. Les ROS inhibent la synthèse des fibres de Col2 et des glycosaminoglycanes et ils régulent à la hausse l'expression du collagène de type I, des MMPs et des cytokines pro-inflammatoires (Zheng et al., 2021).

### 2.2.2.2. Effets du stress oxydatif

Sous stress oxydatif, les chondrocytes subissent la sénescence et l'apoptose, de plus la capacité de synthèse matricielle dans les chondrocytes diminue et la dégradation de la MEC se produit. Le stress oxydatif provoque des modifications des fonctions des ostéoblastes et des ostéoclastes dans l'os sous-chondral, ce qui favorise l'apparition et le développement de l'OA (Figure 6). De plus, l'inflammation synoviale se produit sous stress oxydatif (He et al., 2020).

#### Figure 6

Mécanisme du stress oxydatif dans l'OA



Note. Tiré de « The role of SIRT3-mediated mitochondrial homeostasis in osteoarthritis », par He, Y., 2020, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 1-15. (<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03497-9>)

### 2.2.3. L'inflammation de la membrane synoviale

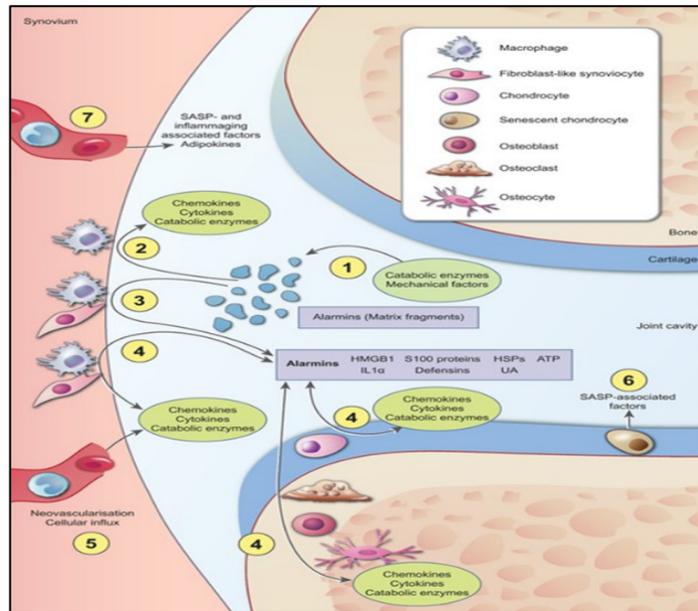
#### 2.2.3.1. *Déroulement du processus inflammatoire dans l'OA*

Les fragments de la matrice extracellulaire du cartilage, libérés à la suite d'un traumatisme initial ou d'une activité enzymatique catabolique augmentent l'inflammation synoviale en stimulant les cellules de la muqueuse synoviale (van den Bosch, 2018). En réponse à de multiples stimulations, les chondrocytes modifient le phénotype et expriment un sous-ensemble de facteurs constitués de cytokines, de chimiokines, d'alarmines, le modèle moléculaire associé aux dommages et des adipokines. La production accrue de cytokines, d'oxyde nitrique, de PGE<sub>2</sub> et de protéinases dégradant le cartilage par les SF entraîne une synovite, un gonflement de l'articulation, des douleurs inflammatoires et la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage (Jang et al., 2021). Par ailleurs, ces cellules sécrètent des niveaux élevés de diverses alarmines qui vont déclencher une boucle de rétroaction positive avec production réciproque de chimiokines, de cytokines et d'enzymes cataboliques, d'une part, et d'alarmines, d'autre part, non seulement dans les cellules synoviales, mais aussi, dans les cellules du cartilage et de l'os périarticulaire. Les facteurs de croissance et les chimiokines renforcent le processus inflammatoire dans l'articulation en stimulant la néovascularisation et l'afflux de cellules inflammatoires qui commencent également à produire des chimiokines, des cytokines et des enzymes cataboliques (van den Bosch, 2018).

En outre, la sénescence cellulaire est associée à une libération accrue de facteurs, tels que de nombreuses cytokines et enzymes cataboliques, appelés phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP), qui stimule davantage l'état inflammatoire de l'articulation. Enfin, l'augmentation des niveaux systémiques de médiateurs inflammatoires résultant du SASP ou du vieillissement et des adipokines résultant de l'augmentation de la masse grasse favorise l'environnement inflammatoire dans l'articulation (van den Bosch, 2018) (Figure 7).

**Figure 7**

*Illustration du processus inflammatoire dans l'OA*



*Note.* Tiré de « Inflammation in osteoarthritis: is it time to dampen the alarmin in this debilitating disease ? » , par van den Bosch, M. H. J., *Clinical and Experimental Immunology*, 195 (2), 153-166.(<https://doi.org/10.1111/cei.13237>)

#### 2.2.3.2. *Manifestation de l'état inflammatoire*

Dans des conditions inflammatoires de l'OA, la membrane synoviale subit un épaissement (hypertrophie et hyperplasie) accompagné d'une infiltration de macrophages et de lymphocytes B et T en faible quantité, une néovascularisation et une fibrose. L'inflammation synoviale est reconnue comme une caractéristique importante des symptômes et de la progression de l'OA (Manferdini et al., 2016). Il est classiquement admis que le processus d'hyperplasie de la synoviale est provoqué par les produits de dégradation du cartilage source d'auto-antigènes activant les cellules résidentes de la synoviale. Il en résulte la production par la synoviale de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-8, le NO, la PGE<sub>2</sub> et de médiateurs pro-angiogéniques comme le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Rannou et al., 2010).

## 2.2.4. Le remodelage osseux

### 2.2.4.1. *Sur le plan morphologique*

Selon certaines études, le remodelage osseux anormal joue un rôle clé dans l'initiation et le développement de l'OA en association avec la dérégulation des ostéoblastes et des ostéoclastes. Au stade précoce de l'OA, il est observé une augmentation de la porosité osseuse sous-chondrale et du remodelage, une réduction de la densité osseuse et une minéralisation osseuse avec une organisation matricielle irrégulière. Ces changements se produisent en même temps ou plus tôt que la destruction précoce du cartilage articulaire. Par ailleurs, au stade avancé de l'OA on note des altérations architecturales de l'os sous-chondral caractérisées par une réduction du remodelage osseux et une densité osseuse sous-chondrale accrue conduisant à la sclérose (Yao et al., 2023).

Un autre élément important est la vascularisation de l'os sous-chondral. En effet, au niveau de l'os sous-chondral arthrosique, on trouve une augmentation des phénomènes de thrombose et d'ischémie régionale. Enfin, dans le cartilage arthrosique, on observe également une néo-angiogenèse à la jonction du cartilage et de l'os sous-chondral soulignant l'importance des phénomènes vasculaires dans l'OA (Rannou et al., 2010).

### 2.2.4.2. *Sur le plan physiologique*

Induit par le stress mécanique faisant office d'élément régulateur, les ostéoblastes d'os sous-chondral arthrosique produisent des agents prodégradation comme la MMP-1, MMP-13, la PGE<sub>2</sub> et l'IL-6. Ces agents vont contribuer à la dégradation non seulement de l'os, mais aussi, du cartilage. Un dialogue permanent semblerait être entretenu entre l'os sous-chondral et le cartilage par l'intermédiaire de molécules pro-inflammatoires et prodégradaisons, mais également, des facteurs de croissance comme IGF-1 et le TGF- $\beta$ , ce qui pourrait signifier la formation des ostéophytes (Rannou et al., 2010).

La contribution de la synoviale à la maladie et à la dégradation du cartilage et la diapasonie entre la synoviale et le cartilage, y compris les voies et l'origine cellulaire des médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'OA nous emmènent à parler des mécanismes de régulation de cette maladie (Chou et al., 2020).

## 3. Les principaux facteurs impliqués dans l'OA

### 3.1. Facteurs cataboliques

Le catabolisme dans l'OA est marqué par la production abondante des métabolites qui favorisent la dégradation de la MEC (Ansari et al., 2020).

#### 3.1.1. Les cytokines

Ce sont des molécules sécrétées par les cellules immunitaires et les principaux acteurs de tout processus inflammatoire, y compris l'OA (Figure 8). De toutes ces cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  jouent un rôle crucial dans l'initiation et le développement de l'OA, car elles font partie des médiateurs sécrétés au début de l'OA (Fernández-Cuadros et al., 2022). L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  conduisent la cascade inflammatoire indépendamment ou en collaboration avec d'autres cytokines. Elles sont produites par les chondrocytes, les synoviocytes et les cellules mononucléaires activées. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  sont utilisés pour provoquer l'inflammation dans des cultures de chondrocytes et de synoviocytes. Lors de la stimulation, les cellules libèrent IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Chow & Chin, 2020).

##### 3.1.1.1. IL-1 $\beta$

C'est un inducteur de la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules. C'est une cytokine produite dans les chondrocytes stimulés qui par induction contribue à la synthèse des MMP-1, MMP-3 et MMP-13. Il est à l'origine de l'aggravation des effets de dégradation de la MEC par le recrutement des cytokines pro-inflammatoires et par l'inhibition de la synthèse des composants clés de la MEC. Il a également été démontré que l'IL-1 $\beta$  induit la production des ROS comme NO. L'IL-1 $\beta$  est couramment utilisée pour induire un modèle d'OA in vitro dans les chondrocytes (Chow & Chin, 2020; Yunus et al., 2020).

##### 3.1.1.2. TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire de haute importance par son implication dans la réponse inflammatoire. En effet, elle a une contribution dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose des cellules. À côté de l'IL-1 $\beta$ , cette cytokine est considérée comme la cytokine pro-inflammatoire clé dans la pathogenèse de l'OA (Molnar et al., 2021).

### 3.1.2. Les chimiokines

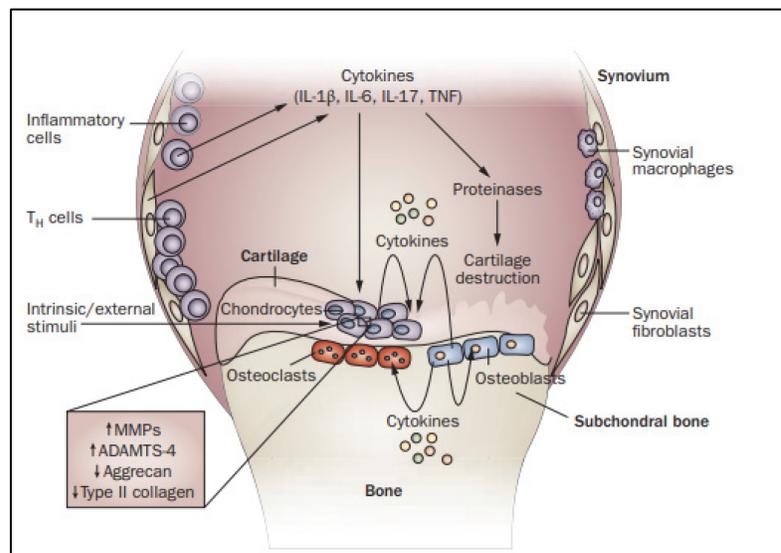
Les chimiokines, également appelées cytokines chimiotactiques, sont de petites molécules capables d'induire la chimiotaxie dans une grande variété de cellules. Elles sont connues en priorité pour leur rôle dans l'attraction et l'orientation des cellules immunitaires effectrices vers les sites d'infection ou d'inflammation. Le tropisme de leur action implique la prolifération, la différenciation et l'activation des réponses cellulaires. Les chimiokines jouent donc un rôle important dans l'inflammation persistante et permanente des articulations arthrosiques (Chow & Chin, 2020; Molnar et al., 2021).

#### 3.1.2.1. *IL-8*

C'est une chimiokine qui est produite par induction de l'IL-1 pour amplifier les effets de dégradation MEC dans la cascade catabolique, en renforçant la destruction des chondrocytes. Il est reconnu aussi comme un marqueur de sénescence cellulaire tout comme la cytokine IL-6 dans le processus appelé phénotype sécrétoire associé à la sénescence (Yunus et al., 2020).

### Figure 8

*Cytokines pro-inflammatoires de l'OA.*



*Note.* Tiré de « Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis », par Kapoor, M., 2011. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(1), 33-42. (<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>)

### 3.1.3. Les protéases

Elles sont préférentiellement attribuées à la famille des MMPs qui joue un rôle majeur dans l'homéostasie du cartilage articulaire (Martel-Pelletier, 2004).

#### 3.1.3.1. Les collagénases

MMP-1 et MMP-13 sont responsables de la dégradation de la structure collagénique. La MMP-13, la protéase qui dégrade préférentiellement le Col2, est peut-être la plus importante dans la progression de l'OA, étant donné que le Col2 est le principal type de collagène dans la MEC. En effet, l'expression de la MMP-13 est fortement accrue dans l'OA. Contrairement à MMP-1, dont le tropisme est favorable dans le liquide synovial de l'OA, la MMP-13 est fortement exprimée dans le cartilage de l'OA, ce qui indique son rôle important dans la dégradation du cartilage articulaire humain tout au long de l'OA (Yunus et al., 2020).

#### 3.1.3.2. Aggrécane

Ce sont des enzymes responsables de la fragmentation des protéoglycanes. Une aggrécane possède des domaines désintégrine et MMP et appartient à la famille des adamalysines (Martel-Pelletier, 2004). Encore appelée stromélysine-1 ou stromélysine, la MMP-3 est une aggrécane responsable de la dégradation des protéoglycanes, et la stromélysine active sert d'activateur des collagénases impliquées dans la dégradation du Col2. Elle est présente à des niveaux élevés dans le liquide synovial de l'OA (Chow & Chin, 2020; Jang et al., 2021; Yunus et al., 2020). La cytokine IL-1 $\beta$  stimule la production de la MMP-3 et de l'ADAMTS-5 (Chow & Chin, 2020).

### 3.1.4. Les médiateurs inflammatoires

#### 3.1.4.1. iNOS

L'enzyme NO Synthase Inductible (iNOS) qui produit le radical libre NO est modulé dans l'OA. En effet, l'IL-1 $\beta$ , augmenté entre autres lors d'une charge mécanique du cartilage, induit une régulation à la hausse du gène iNOS, qui augmente à son tour la production de NO. Le NO élevé contribue à la dégradation articulaire en augmentant la synthèse de MMP via des voies dépendantes du GMP cyclique (GMPc) tout en inhibant la synthèse du Col2 et du protéoglycane (Chow & Chin, 2020; Yunus et al., 2020). NO est également impliqué dans la médiation de l'apoptose des

chondrocytes, une caractéristique de la progression de l'OA. Par ailleurs, le NO altère aussi la fonction mitochondriale dans les chondrocytes atteints d'OA, ce qui entraîne une réduction de la survie cellulaire en inhibant l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et la synthèse de l'ATP.

#### 3.1.4.2. COX-2

L'expression de l'enzyme cyclooxygénase-2 (COX-2), qui produit la PGE<sub>2</sub> est également modulée dans l'OA. La cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  stimule la régulation à la hausse de la PGE<sub>2</sub> en induisant l'expression génétique ou l'activité de la COX-2. L'activation de la cyclooxygénase (COX) augmente la production de MMP-3 tout en inhibant la synthèse des protéoglycanes et du collagène et en induisant l'apoptose des chondrocytes. La régulation positive du chondrocyte par la stimulation de l'IL-1 $\beta$ , conduit finalement à une production accrue de PGE<sub>2</sub>. L'augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> provoque la résorption du cartilage en supprimant la production de protéoglycanes, en augmentant la dégradation de l'agrécan et du Col2 et en potentialisant les effets d'autres médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6 et la MMP-13 (Chow & Chin, 2020; Yunus et al., 2020).

### 3.2. Facteurs anaboliques

Ils concernent entre autres les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, etc.) et les facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , IGF-1, etc.) (Fernández-Cuadros et al., 2022).

#### 3.2.1. Les cytokines anti-inflammatoires

##### 3.2.1.1. IL-4

L'IL-4 est un important régulateur du système immunitaire souvent appelé la cytokine immunorégulatrice prototypique. Elle est sécrétée par les cellules Th2, les éosinophiles, les basophiles et les mastocytes. La production d'IL-4 est principalement déterminée par les cellules T (Th2) infiltrant la synoviale de l'articulation. IL-4 a un effet chondroprotecteur notable. Elle inhibe la sécrétion des MMPs, réduit la variation de la production de protéoglycanes visible au cours de l'OA et, par conséquent, a un effet inhibiteur sur la dégradation des protéoglycanes dans le cartilage articulaire. Compte tenu de son effet chondroprotecteur et de ses effets sur d'autres lignées cellulaires, il n'est pas surprenant que l'IL-4 diminue la synthèse de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Molnar et al., 2021). De ce fait, l'IL-4 diminue également la

sécrétion d'autres médiateurs inflammatoires tels que PGE<sub>2</sub>, COX-2, PLA2 et iNOS (Wojdasiewicz et al., 2014).

#### 3.2.1.2. *IL-10*

L'IL-10 est une autre cytokine aux propriétés anti-inflammatoires multiples. L'IL-10 a une structure qui s'apparente aux interférons. IL-10 est synthétisée prioritairement par les cellules immunitaires, mais aussi, par les chondrocytes, où elle joue un rôle dans le processus de reconstitution de la MEC du cartilage. En se fixant sur son récepteur, l'IL-10R, cette cytokine active la voie intracellulaire de la kinase JAK- STAT et stimule l'expression des gènes dépendant de l'IL-10 (Wojdasiewicz et al., 2014). Le produit final de cette stimulation est un effet chondroprotecteur, anti-apoptotique et anti- inflammatoire causé par la stimulation de la synthèse du Col2 et de l'agrécan, ainsi que par l'inhibition de la synthèse des MMPs. Par ailleurs, l'IL-10 exprime ses propriétés anti-inflammatoires majeures par la stimulation de la synthèse de l'antagoniste à IL-1 $\beta$ , STAT-3 (Sun et al., 2019). par les macrophages et l'inhibition du TNF $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-12, s'o posant ainsi à leur effet pro-inflammatoire.

### 3.2.2. Les chimiokines anti-inflammatoires

#### 3.2.2.1. *Le TGF- $\beta$*

La superfamille des facteurs de croissance et des cytokines TGF- $\beta$  est un ensemble de plus de 30 protéines impliquées dans divers processus biologiques tels que la réponse immunitaire, le contrôle de la croissance, la différenciation cellulaire, le développement précoce et, plus spécifiquement, la squelettogénèse. Le TGF- $\beta$  peut être produit et sécrété par différents types de cellules au sein de l'articulation, comme les chondrocytes articulaires, les synoviocytes fibroblastiques et les macrophages. Le TGF- $\beta$  a la capacité de stimuler la synthèse des protéoglycanes et d'inhiber la différenciation des chondrocytes hypertrophiques et la répression de l'effet négatif de l'IL1- $\beta$ . Cependant, les effets sur la formation d'ostéophytes, la synovite et la fibrose semblent être fortement limités (Cherifi et al., 2021).

#### 3.2.2.2. *L'IGF-1*

IGF-1 est un facteur de croissance qui circule dans le plasma et qui est exprimé par la plupart des types de cellules. L'IGF-1 a des effets importants sur le développement, la croissance cellulaire, la différenciation et la réparation des tissus. L'IGF-1 serait capable de bloquer l'inflammation, le stress

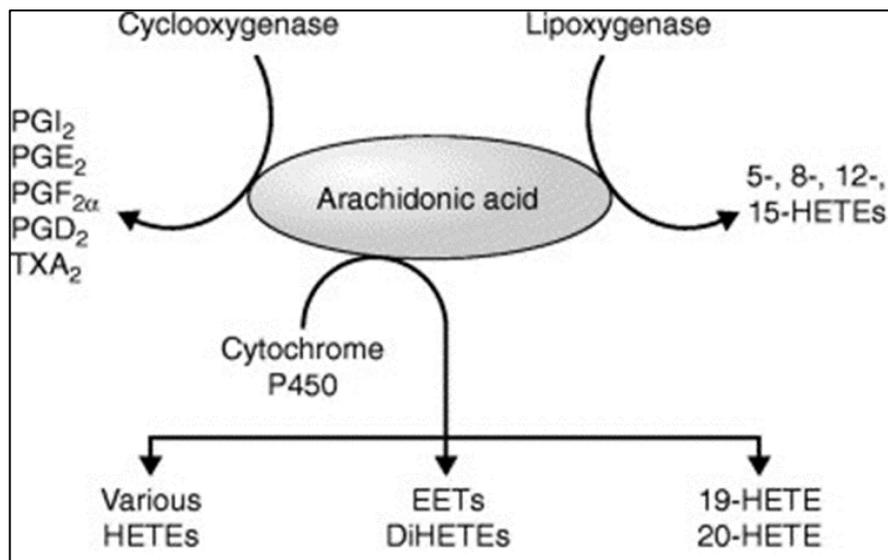
oxydatif et le dysfonctionnement endothélial. De fait, l'IGF-1 aurait des attributs anti inflammatoires et pro-réparateurs (Fernández-Cuadros et al., 2022).

#### 4. Les voies oxydatives des eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des molécules de signalisation synthétisées par trois voies principales (Figure 9), à savoir la COX, la lipoxygénase (LOX) et la monooxygénase du cytochrome P 450 (CYP450). Ils regroupent les prostaglandines (PGs), les tromboxanes (TXs), les LTs et les lipoxynes (LXs), qui sont obtenus à partir de l'oxydation enzymatique du précurseur l'acide arachidonique (AA) (Chhonker et al., 2018; Zhai, 2019). Les eicosanoïdes sont impliqués dans l'homéostasie ainsi que dans l'initiation, le maintien et la résolution de l'inflammation (Artru et al., 2022).

**Figure 9**

*Les voies de synthèses des eicosanoïdes*



*Note.* Tiré de « HETEs/EETs in renal glomerular and epithelial cell functions », par Natarajan, R, 2003. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(2), 198-203. ([https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(03\)00015-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1471-4892(03)00015-8))

#### **4.1. L'acide arachidonique**

L'AA est un acide gras polyinsaturé oméga 6 (AGPI ( $\omega$ -6)) à chaînes de 20 carbones comportant quatre doubles liaisons (20:4). C'est un des plus importants dans l'homéostasie énergétique ainsi que dans la mise en place de l'inflammation (Ghandour et al., 2016). L'AA doit être fourni par l'alimentation, car c'est un acide gras essentiel (AGE) (Razdan et al., 2021). L'AA se trouve dans la membrane cellulaire sous forme de phospholipides. Lorsque la membrane cellulaire est soumise à des stimuli, en particulier la réaction inflammatoire, les phospholipides sont libérés de la membrane cellulaire. Par l'hydrolyse des phospholipides par la PLA2 et la PLC, l'AA est libéré puis transformé en un métabolite bioactif à l'aide de différents enzymes, favorisant ainsi les cascades inflammatoires (Wang et al., 2019).

#### **4.2. Les cyclo-oxygénases (COX)**

Les COX sont des enzymes limitant pour la synthèse du PG et comprennent deux isoformes : COX-1 et COX-2. La COX-1 est une enzyme d'entretien qu'on retrouve dans presque tous les tissus et catalyse la production de PG, ce qui n'est pas le cas de la COX-2. Cependant, lors de la stimulation, les fibroblastes et les macrophages mononucléaires expriment rapidement la COX-2 en grande quantité pour catalyser la production de PG (Sun et al., 2021).

#### **4.3. Le cytochrome P 450**

Les enzymes du cytochrome P 450 (CYP) sont un groupe d'enzymes codés par les gènes P 450. Elles sont exprimées sous forme de protéines liées à la membrane, que l'on trouve habituellement dans le réticulum endoplasmique du foie. Les enzymes CYP fonctionnent comme des monooxygénases et effectuent l'oxydation par le transfert d'un atome d'oxygène à travers un long processus (Agarwal et al., 2018). La voie de signalisation CYP dans le métabolisme des AA implique les  $\nu$ -hydroxylases et les époxygénases. Les  $\nu$ -hydroxylases convertissent l'AA en acides hydroxy-éicosatétraénoïques (HETE) et les époxygénases le convertissent en acides époxy-éicosatriénoïques (EET) (Brücher & Jamall, 2019)

#### **4.4. Les lipoxygénases**

Les LOX sont une famille d'enzymes qui catalysent l'oxygénation des AGPI, à l'instar de AA, l'acide dihomogamma-linoléique (DLA), l'acide linoléique (LA), l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) pour former des métabolites eicosanoïdes qui fonctionnent dans

les voies inflammatoires de manière autocrine, paracrine ou endocrinienne. Les produits bioactifs générés par les enzymes LOX sont impliqués dans les activités pro et anti-inflammatoires (Kulkarni et al., 2021).

#### 4.4.1. Localisation des LOX

Les LOX des mammifères se retrouvent dans différents types de cellules et de tissus impliqués dans les fonctions immunitaires appartenant à la fois à la cascade de coagulation et aux systèmes de réponse immunitaire des cellules circulantes et résidentes. Dans la cellule, LOX peut être associée aux membranes lipidiques, et la localisation subcellulaire peut changer lors de la stimulation cellulaire. La plupart des formes humaines de LOX agissent principalement comme des S-lipoxygénases (Wood et al., 2020).

#### 4.4.2. Classification et distribution des LOX

LOX est présent dans deux (bactéries, eucarya) des trois domaines de la vie terrestre. Mais, leur présence chez les archées reste incertaine (Ivanov et al., 2015). Les LOX sont exprimés dans tous les types cellulaires d'origine hématopoïétique, tels que les plaquettes et les leucocytes (Tableau 3). Leur nomenclature est basée sur le point d'insertion de l'oxygène sur leur substrat d'AG (Kulkarni et al., 2021).

**Tableau 3**

*Gènes ALOX et principaux sites d'expression des isoformes LOX correspondantes*

Gène humain	Nom formel	Gène de souris	Nom formel	Sites majeurs d'expression
ALOX15	12/15-LOX	Alox15	lc12-LOX*	Éosinophiles, épithélium bronchique
ALOX15B	15-LOX2	Alox15b	8-LOX	Racine des cheveux, peau, prostate
ALOX12	pl12-LOX**	Alox12	pl12-LOX	Thrombocytes, peau
ALOX12B	12R-LOX	Alox12b	12R-LOX	Peau
ALOXE3	eLOX3	Alox3	eLOX3	Peau
ALOX5	5-LOX	Alox5	Alox5	Leucocytes, macrophages, cellules dendritiques
Pseudogène		Alox12e	elox12	Peau

\*lc – de type leucocytaire, et \*\*pl – de type plaquettaire

*Note.* Adapté de (Kulkarni et al., 2021)

#### 4.4.2.1. *Chez l'humain*

Les enzymes LOX humains comprennent la 5-lipoxygénase (5-LOX), qui entraîne la production de LTs, ainsi que les 12-lipoxygénases et les 15-lipoxygénases. Le génome humain implique six gènes LOX fonctionnels (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5), qui codent pour six isoformes LOX différentes (Tableau 3). À l'exception du gène ALOX5, qui a été mappé au chromosome 10, tous les autres gènes LOX sont localisés dans un groupe de gènes articulaires sur le chromosome 17 (Kulkarni et al., 2021).

#### 4.4.2.2. *Chez la souris*

Le génome de la souris compte sept gènes LOX fonctionnels (Alox5, Alox15, Alox15b, Alox12, Alox12b, Alox3, Alox12) parmi lesquels on retrouve l'ensemble des gènes présent chez l'humain avec en plus le gène Alox12 qui est présent chez ce dernier en tant que pseudogène (Ivanov et al., 2015). En effet, les espèces supérieures ont une distribution génomique identique des gènes LOX. Tous les gènes Alox de la souris, à l'exception d'Alox5, sont situés dans les groupes LOX 1 et 2 du chromosome 11 (Kulkarni et al., 2021).

Les souris Alox12, Alox12b, Alox3 et Alox5 ont le même degré de conservation des acides aminés avec leurs orthologues humains et présentent des propriétés enzymatiques similaires. Cependant, ce n'est pas le cas pour la souris Alox15 et la souris Alox15b (Tableau 3). En fait, la souris Alox15 est une enzyme 12-lipoxygénase qui convertit l'AA principalement en 12S-HPETE. Alors que son orthologue humain a une activité 15-lipoxygénase. Inversement, la souris 12-lipoxygénase, Alox15 peut facilement être convertie en une enzyme 15-lipoxygénase (Ivanov et al., 2015).

#### 4.4.3. Propriétés enzymatiques des LOX

Le cycle catalytique de la fonction LOX implique quatre réactions élémentaires qui se succèdent :

i) L'extraction d'hydrogène d'un méthylène bisallylique créant un radical d'acide gras centré sur le carbone, ii) Le réarrangement du radical d'acide gras, iii) La formation d'un radical peroxy centré sur l'oxygène par l'introduction de dioxygène moléculaire, et iv) La transformation du radical hydroperoxy en l'anion correspondant. Le retrait d'hydrogène semble être l'étape limitant la vitesse du cycle catalytique et cette réaction élémentaire implique un transfert d'hydrogène par effet tunnel.

Ainsi, les LOX peuvent être considérées comme des enzymes chimiques quantiques et certains aspects des mécanismes de réaction ne peuvent pas être décrits de manière adéquate en utilisant la méthode traditionnelle de la thermodynamique.(Kuhn et al., 2015).

Les enzymes LOX insèrent ainsi de l'oxygène moléculaire dans l'AA et, selon leur position, 4 acides hydroperoxy éicosatétraénoïques (HPETE ; 5-, 8-, 12- et 15-HPETE) sont formés par les enzymes LOX correspondantes, c'est-à-dire 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX et 15-LOX. Les HPETE sont ensuite réduits en acides monohydroxy éicosatétraénoïques (HETE) par les peroxydases, ou convertis en composés biologiquement actifs tels que les LT, les LXs et les hépoxilines (Wang et al., 2021).

#### 4.4.4. Fonction biologique des LOX

Les LOX exercent leur bioactivité en formant des médiateurs lipidiques qui vont agir sur une population cellulaire donnée modifiant ainsi le phénotype fonctionnel. Les isoformes LOX peuvent procéder par l'oxydation des esters de complexes lipidiques, et même des assemblages lipides-protéines dans les membranes lipoprotéiques pour modifier la structure et la fonction de ces derniers. Cette fonction des LOX est observée dans l'érythropoïèse, la différenciation épidermique et l'athérogenèse. Les LOX peuvent aussi procéder à la peroxydation des lipides pour former des peroxydes et entraîner la perturbation de l'état redox cellulaire. Étant donné que l'équilibre redox cellulaire est un régulateur important de la prolifération cellulaire et de l'expression génique, l'activité LOX intracellulaire peut avoir un impact sur la fonctionnalité cellulaire. Ainsi, l'activité catalytique de LOX contribue clairement à l'homéostasie redox cellulaire (Kuhn et al., 2015) .

#### 4.4.5. Les LOX dans l'inflammation

Les LOX sont des enzymes clés dans la biosynthèse des eicosanoïdes linéaires et des médiateurs apparentés provenant d'autres AG polyénoïques (LTs, lipoxines, résolvines, marésines, hépoxilines, éoxines, etc.) et ces composés ont été impliqués comme favorisant et/ou protégeant contre l'inflammation pathogène. Cependant, le rôle physiopathologique de LOX peut ne pas se limiter à la formation de lipides de signalisation. Les LOX sont des peroxydases lipidiques et leur activité catalytique peut avoir un impact sur l'état redox cellulaire. Étant donné que l'état redox est un régulateur important du modèle d'expression génique cellulaire, l'activité catalytique de l'enzyme peut modifier le phénotype fonctionnel des cellules de mammifères (Kuhn et al., 2015).

#### 4.4.5.1. *Propriétés pro-inflammatoires*

Une réaction inflammatoire s'installe dans l'organisme lorsque celui-ci émet une réponse protectrice contre des agents inflammatoires. Cette réponse engage divers éléments du système immunitaire et des constituants cellulaires qui vont fonctionner en synergie, tandis que les médiateurs inflammatoires auront une activité coordonnée. L'inflammation aiguë, de même que sa résolution est régulée par des médiateurs lipidiques et non lipidiques. Les LTs qui figurent dans cette catégorie comme étant des médiateurs pro-inflammatoires sont formés dans les leucocytes et d'autres cellules immunitaires à partir de l'AA libre via la voie ALOX5 (Kuhn et al., 2015).

#### 4.4.5.2. *Propriétés anti-inflammatoires*

La résolution de l'inflammation est un processus à caractère actif, qui vise à rétablir l'homéostasie tissulaire normale en suivant un programme biologique adéquat. La résolution inflammatoire débute par des renouvellements à caractère protecteur des composants cellulaires du tissu enflammé les cellules immunitaires en vue de favoriser un retour à l'homéostasie, il s'agit d'un processus qui comprend la clairance active du stimulus pathogène, le catabolisme des médiateurs pro-inflammatoires et l'induction de la mort des cellules immunitaires et l'élimination non pathologique des cellules immunitaires (Gilroy, 2021). En effet, lymphocytes et macrophages pro-inflammatoires sont remplacés par des macrophages anti-inflammatoires qui débarrassent le champ de bataille et par un changement dans la signalisation inflammatoire : la régulation à la baisse de la formation de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (PGs, LTs) et activation de la biosynthèse des médiateurs anti-inflammatoires (pro-résolution). Les médiateurs lipidiques pro-résolutions endogènes comprennent un certain nombre de produits LOX tels que les LXs, les RVs, les protectines, les marésines et d'autres. L'interaction spécifique des médiatrices prorésolutions avec les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR 32, ALX, BLT1) à la surface des cellules immunitaires induit un certain nombre de processus prorésolution. En effet, on assiste à la réduction de la migration des leucocytes, la restitution l'intégrité de la perméabilité vasculaire, l'apoptose des neutrophiles pro- inflammatoires et la phagocytose des neutrophiles apoptotiques, les restes bactériens et les débris nécrotiques par les macrophages anti-inflammatoires. Cependant, si une résolution adéquate de l'inflammation sert à prévenir les lésions tissulaires conduisant à la "restitutio ad integrum", une résolution inadéquate entraîne une inflammation chronique (Kuhn et al., 2015).

## 4.5. Les oxylipines et la 12-HETE

### 4.5.1. Les oxylipines

Les oxylipines sont des AGPI oxygénés qui régulent l'inflammation, la réponse vasculaire et la réponse hyperémique coronarienne. Les LOX, COX et CYP 450 sont trois familles d'enzymes qui sont capables d'être mono- ou dioxygénées en différentes classes d'oxylipines les AGPI libres. Les oxylipines ne sont pas stockées, mais, synthétisées de novo et étroitement régulées, car elles sont à la fois efficaces, et, ont une courte durée. Elles exercent leur effet de façon paracrine ou autocrine. Les différentes classes d'oxylipines comprennent les EET, les HETE et les prostanoïdes ayant comme précurseur commun l'AA, et les EpOME et les HODE ayant comme précurseur l'AL (Nayeem, 2018).

### 4.5.2. Les HETE

Les HETE sont des oxylipines, qui proviennent de la conversion de l'AA en produits hydroperoxy (HpETEs) dans les voies COX et LOX et ensuite de la réduction des HpTETEs en acides gras monohydroxylés (HETE) par les peroxydases (Powell & Rokach, 2015). Dans la voie Cyp 450, les HETEs sont obtenus à la suite de l'hydroxylation de l'AA. Effet, trois types de produits sont formés dans cette voie: les métabolites  $\omega$ -hydroxy, les produits d'hydroxylation bisallylique, et les HETE similaires à ceux formés par les lipoxygénases (Powell & Rokach, 2015; Razdan et al., 2021).

### 4.5.3. La 12-HETE

C'est un médiateur lipidique obtenu par l'oxygénation du 12<sup>e</sup> carbone de l'AA par la 12-LOX en 12-HEPTE, suivi de sa réduction de ce produit par la glutathion-péroxydase en un composé hydroxylé analogue plus stable, le 12(S)-HETE, ou simplement 12-HETE (Maayah & El-Kadi, 2016). La 12-HETE peut aussi être produite par la voie de la 12/15 LOX et le cytochrome P 450 (Porro et al., 2014).

#### 4.5.3.1. Classification

La 12-HETE est produite par le 12-LOX humain et murin. Cependant, l'enzyme LOX codée par le gène murin Alox15 entraîne la production du 12-HETE et de 15-HETE à un rapport de 6: 1 à partir de l'AA, et a été désigné 12-LOX de type leucocytaire ou simplement « 12/15-LOX ». Chez l'homme, son orthologue est codé par ALOX15 et a été désigné « 15-LOX-1 » ou réticulocyte humain de type 12/15-LOX. Son activité favorise la production de 15-HETE et conduit à de petites

quantités du 12-HETE dans un rapport de 9:1 à partir de l'AA. Ainsi, le 12-HETE est un produit de 12-LOX et 12/15-LOX chez la souris, et 12-LOX et 15-LOX-1 chez l'homme (Kulkarni et al., 2021).

**Tableau 4**

*Classification du 12-HETE et la 15-HETE chez la souris et l'humain*

<b>LOXs</b>	<b>12-LOX</b>	<b>15-LOX-1</b>	<b>12/15LOX</b>
<b>Souris</b>	12-HETE*	15-HETE	12-HETE
<b>Humain</b>	12-HETE	12-HETE**	15-HETE
De type leucocytaire * et de type réticulocyte **			

#### 4.5.3.2. Récepteurs du 12-HETE

La 12-HETE peut se fixer sur 4 différents récepteurs que sont : BLT2, TXA2, PPAR $\gamma$  et GRP31/12-HETER (Napolitano, 2019). BLT2 est un RCPG ou GPCR de la 12-HHT et la LTB4 (Okuno & Yokomizo, 2018). Les eicosanoïdes comme la 12-HETE) et la 12(S)-HPETE entrent en compétition pour la fixation de la LTB4 de manière dose-dépendante sur des fractions membranaires de cellules CHO exprimant la BLT2 humaine, mais, avec une faible affinité (Tager & Luster, 2003).

Le GPR31, (G-protein-coupled receptor 31), a une forte affinité pour le 12-HETE, comparé aux autres eicosanoïdes tels que LTB4 et 15(S)-HETE, et a été renommé 12-HETER et, plus tard, 12-HETER/GPR31. Le 12-HETE se lie spécifiquement aux cellules CHO transfectées par le GPR31, alors qu'aucune liaison de haute affinité n'a été observée pour le stéréo-isomère 12(R)-HETE (Napolitano, 2019).

#### 4.5.3.3. *Fonction*

La 12-HETE est un produit eicosanoïde particulier des 12-LOX, des enzymes métaboliseurs de lipides qui sont exprimés dans tous les tissus biologiquement actifs et qui régulent différents processus cellulaires par l'intermédiaire de leurs produits eicosanoïdes. Dans des conditions homéostatiques, les eicosanoïdes de la 12-LOX partagent des fonctions diverses: la régulation de l'inflammation, l'agrégation plaquettaire, la migration cellulaire et la modulation de la perméabilité vasculaire (Kulkarni et al., 2021; Powell & Rokach, 2015).

La 12-HETE et GPR31 sont impliqués dans la régulation de nombreux processus pathologiques par un mécanisme qui les décrit mieux. Au cours de la recrudescence d'une maladie chronique, il a été révélé que lorsque survient une augmentation du 12-HETE, celle-ci agit comme un ligand pour le GPR31, activant les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et MAPK pour favoriser la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, ainsi que le recrutement et l'activation des leucocytes (Zhang et al., 2018). En effet, le récepteur lipidique GPR31, un RCPG orphelin de classe A, a aussi été reconnu comme un récepteur 12-HETE impliqué dans la régulation des signaux inflammatoires dans les cellules PC3 de la prostate (Morgan et al., 2010).

Cependant, il se pourrait que la 12-HETE ait des effets pro- et anti-inflammatoires car les 12-LOX ont la capacité d'oxygéner plusieurs AGPI en médiateurs en aval ayant des effets pro- et anti-inflammatoires (Doren et al., 2021; Kulkarni et al., 2021).

## 5. Hypothèse de recherche et objectifs

L'OA est la maladie articulaire la plus fréquente au Canada et dans le monde. C'est un trouble musculosquelettique qui se caractérise par la destruction irréversible du cartilage articulaire et l'érosion osseuse, induites entre autres par des cytokines pro-inflammatoires (Dragos et al., 2017). Il n'existe actuellement aucun traitement efficace contre l'OA.

La 12-LOX catalyse la biosynthèse de nombreux médiateurs aux propriétés pro- et anti-inflammatoires tel que les oxylipines particulièrement la 12-HETE. La 12-HETE est une eicosanoïde dont l'implication a été soulignée dans l'instauration des processus inflammatoires (Duchez et al., 2015) dans les cellules plaquettaires, ayant à cet effet des propriétés pro- et antithrombotiques (Maskrey et al., 2014), mais aussi, par sa capacité à interagir avec les molécules pro-résolutions pour induire une réponse anti-inflammatoire. Ainsi, certaines études l'ont qualifié de médiateur pro- et anti-inflammatoire. Par ailleurs, il a été démontré que la 12-HETE est capable de se lier avec une forte affinité à un RCPG, le GRP31, qui est capable de moduler son activité dans la cellule (Doren et al., 2021). Cependant aucune étude n'a révélé son implication dans la pathogénèse de l'OA.

Notre hypothèse est que l'acide 12-Hydroxyeicosatétraénoïque (12-HETE) a un effet sur les réponses cataboliques et inflammatoires dans les tissus articulaires affectés par l'OA. Notre objectif est de déterminer le rôle du 12-HETE dans la régulation de la pathogénèse de l'OA. Les objectifs spécifiques de ce travail sont :

1. de déterminer l'effet de 12-HETE sur la prolifération des chondrocytes et synoviocytes en culture
2. de déterminer l'effet du 12-HETE sur la migration des chondrocytes synoviocytes en culture
- 3 d'établir les niveaux d'expression du récepteur spécifique par lequel 12-HETE agit, notamment le GRP31.

Les deux premiers objectifs ont été réalisés *in vitro*, dans des cellules humaines et le troisième objectif a été réalisé avec des tissus *ex vivo*, provenant de l'humain et du chien comme modèle animal.

## **Chapitre 2 – Méthodologie**

## 1. Matériels et réactifs

Pour la culture cellulaire, nous avons eu besoin lors de la dissection des tissus de deux boîtes de 500 ml (millilitre) de solution de Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (D-PBS ou PBS 1X) sans magnésium et calcium (Multicell Wisent, St-Bruno, Qc, Canada); d'une boîte de 500 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant 4,5g/L de glucose avec du L-glutamate et du pyruvate de sodium (Multicell Wisent, St-Bruno, Qc, Canada); et une boîte de 100 ml d'antibiotique Pénicilline et Streptomycine (P/S) contenant 100000 IU de Pénicilline et 10000 g/ml de Streptomycine (Multicell Wisent, St-Bruno, Qc, Canada). Pour la digestion nous avons eu besoin en plus d'un flacon de protéase provenant de *Streptomyces griseus* et un flacon de collagénase provenant de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); une boîte de 100 ml de Trypsine/EDTA stérile contenant 0,25 % de Trypsine et 2,21 mM d'EDTA 4 Na (Multicell Wisent, St-Bruno, Qc, Canada). Pour trypsiniser les cellules avant le passage, nous utilisons une boîte de 100 ml de Trypsine/EDTA stérile contenant 0,05 % de Trypsine et 0,53 mM d'EDTA avec du bicarbonate de sodium (Multicell Wisent, St-Bruno, Qc, Canada). Pour effectuer le comptage des cellules ou numérisation cellulaire manuelle, nous avons eu besoin d'une bouteille de 100 ml de bleu Trypan 0,4 % (Gibco by Life Technologies, Burlington, ON, Canada). L'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) recombinante humaine a été obtenue chez *Genzyme* (Sanofi US, Bridgewater, NJ, USA).

Pour la lyse cellulaire, nous avons apprêté une solution de 1  $\mu$ g/ml d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases; une solution de 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); ensuite, des préparations maison de solutions de : 20 mM de Tris pH 7.4; 150 mM de NaCl; 1mM d'EDTA pH 7.4 et 0,5 % de SDS (Multicell Wisent, St-Bruno, Qc, Canada).

Pour la quantification des protéines, nous avons eu besoin du kit « Pierce BCA protein assay » (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Nous avons utilisé le kit « MTT cell proliferation assay » (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) pour effectuer le test de prolifération cellulaire. Le kit « Mini-PROTEAN System » (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) nous a servi pour effectuer le Western blot des protéines. Pour la préparation du gel nous avons utilisé une solution d'acrylamide (SERVA Electrophoresis GmbH); les solutions de tampon 4X Tris Cl/SDS pH 8.8 et de tampon 4X Tris Cl/SDS pH 6.8 et une solution d'APS à 10 % (Multicell Wisent, St-Bruno, Qc, Canada) et une solution de TEMED (Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA, USA). Les anticorps polyclonaux qui ont permis de révéler la présence des protéines comprenaient l'anti-(COX-2, iNOS, mPGES-1) humains et le kit d'anticorps pour l'acide 12(S)-Hydroxyicosatétraénoïque (12-HETE) pris chez « Cayman Chemical » (Ann Arbor, MI, USA), les anticorps anti-hMMP-13 et anti-h/m/ $\beta$ -Actin chez « R&D systems » (Minneapolis, MN, USA). L'anticorps anti-MMP-1 de Calbiochem (EMD chemicals, inc, San Diego, CA, USA) et le kit d'anticorps anti-GRP31 chez « Abcam» (Abcam inc, Toronto, ON, Canada).

L'hématoxyline Weigert 50 %, la safranine *O* et le Fast Green (Entellan-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nous ont permis d'effectuer la coloration des coupes histologiques.

Pour effectuer l'immunohistochimie, nous avons eu besoin du kit « VECTASTAIN Elite ABC system »; une solution de xylène; une solution d'éosine, solution; une solution de travail du tampon PBS 10X pH 7.4; une solution de triton 100X et une solution de peroxyde d'hydrogène (Thermofisher Scientific, Burlington, ON, Canada); un kit d'anticorps anti-GRP31 (Abcam inc, Toronto, ON, Canada); le kit VECTASTAIN Elite ABC system (Vector Laboratories, Newark, Ca, USA.); une colle liquide de montage rapide pour la microscopie (Entellan-Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); et le kit DAB Peroxidase Substrate, SK-4100 (MJS Biolynx, Brockville, ON, Canada).

Les amorces de PCR, de RT-PCR, les réactifs RNAlater, Trizol, la reverse transcriptase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ou M-MLV RT), le mélange Fast SYBR Green Master et les éléments pour effectuer l'électrophorèse sur gel d'agarose ont été achetés chez Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Les amorces de PCR en temps réel et GAPDH ont été achetées chez IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA).

## 2. Méthodes

### 2.1. Collecte des échantillons en pathologie

Le processus de collecte des échantillons comprend l'appel téléphonique, le déplacement au lieu de collecte et le transport des échantillons recueillis dans un milieu adéquat jusqu'au laboratoire. La collecte des échantillons se déroule au sein du service de pathologie du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Elle se fait deux à trois fois par semaine, mais, avant de nous y rendre, nous devons nous assurer, par appel téléphonique, de la présence des échantillons apprêtés pour la recherche par le personnel en place. Les échantillons collectés sont essentiellement les genoux provenant de la chirurgie des patients atteints d'OA, mais aussi ceux d'autres articulations comme l'épaule et la hanche. Les cartilages d'OA provenaient de condyles fémoraux altérés, mais non détruits, obtenus chez des patients ayant subi une chirurgie de prothèse totale du genou (Guo et al., 2008).

Chaque échantillon se trouve dans un contenant en plastique, emballé dans un « zip lock » accompagné d'une fiche d'identification du prélèvement. Une fois collectés, les échantillons sont transportés dans une boîte en polystyrène muni d'un couvercle jusqu'au laboratoire au centre de recherche. Dès lors, ils suivent un procédé d'enregistrement qui comprend l'identification de la nature du tissu collecté, la qualité ou l'état (frais ou pas) du prélèvement, ainsi que la quantité. Après ce procédé, il s'ensuit un triage des échantillons où ceux qui ne sont plus viables en ce sens qu'ils ne contiennent pas assez de cartilage ou ont eu une durée de conservation excédant 4 à 5 jours après la chirurgie sont simplement écartés de la recherche.

Après le triage, tous les échantillons sont débarrassés de toute information identificatoire, ensuite sont codifiés et stockés dans la chambre froide à 40C en attendant d'être traités. Les fiches d'identification sont rangées dans un registre avec le code correspondant de chaque échantillon. Les échantillons non utilisables sont quant à eux déposés dans le bac à déchets biologiques dans une autre chambre froide pour incinération.

De manière générale, nous recevons au laboratoire deux types de tissus émanant de la chirurgie: des boîtes qui contiennent que des os de genoux où on retrouve un morceau de patella avec le plateau, deux condyles et des morceaux de cartilages et graisses d'où se loge la membrane synoviale; et des boîtes où on retrouve une tête fémorale.

## 2.2. Culture cellulaire

La culture cellulaire renvoie à un long processus qui englobe plusieurs étapes qui débutent par la collecte des tissus de cartilage et de synoviale jusqu'à l'obtention des chondrocytes et des synoviocytes respectivement.

### 2.2.1. La dissection des tissus

Elle consiste à découper en petits morceaux les tissus d'os de genoux des patients. Le diagnostic des échantillons renvoie toujours soit à une OA, une arthrite et/ou à une fracture de l'os concerné. Les échantillons de fractures peuvent servir parfois de contrôle. Les tissus retenus pour la culture cellulaire sont ramenés en salle de culture pour effectuer la dissection. Elle se déroule sous la hotte aspirante où à l'aide d'un scalpel, le cartilage est retiré sur les tissus et découpé en petits morceaux, de la surface jusqu'à 5 mm de l'os; tandis que les morceaux de graisse sont eux aussi disséqués en petits morceaux. Les deux tissus récoltés sont mis séparément dans un pot stérile chacun avant d'être décontaminés avec environ 100 à 150 ml de PBS 5X (5 ml d'antibiotique P/S dilué dans 500 ml de PBS 1X) pendant une heure (h) et ensuite ils sont lavés 2 fois à froid avec du PBS 1X avant de passer à la digestion proprement dite. En effet, les tissus sont activement lavés en solution saline froide afin d'éliminer le sang et le liquide synovial (Guo et al., 2008).

Il peut arriver des circonstances où la digestion ne se passe pas le même jour que la dissection, dans ce cas les tissus découpés seront conservés dans des pots stériles dans 100 ou 150 ml du milieu DMEM 10X (5ml de P/S dilué dans 500 ml de DMEM normal auquel on a ajouté 50 ml de de FBS) pendant 2 à 3 jours dans l'étuve à 37°C.

### 2.2.2. La digestion

Le processus de digestion des tissus repose sur l'action menée par un groupe d'enzymes appelés protéases, qui ont pour fonction d'assurer la transformation de la structure complexe des protéines en des petites molécules de polypeptides ou à leur sous-unité fonctionnelle que sont les acides aminés (López-Otín & Bond, 2008). Ces enzymes sont la trypsine, la pronase et la collagénase qui nous permettent d'obtenir des cellules à partir des tissus disséqués. La trypsine est une enzyme permettant la rupture des liaisons entre les cellules et le support de culture lors des passages des cellules (Grosseron, 2023). Associée à l'EDTA, sous la formule trypsine-EDTA, son rendement en

cellules dissociées fonctionnellement viables est maximisé pour dissocier les tissus et les monocouches cellulaires (Sutradhar et al., 2010). La pronase est une enzyme protéase utilisée pour digérer les protéines de la matrice extracellulaire afin d'isoler les chondrocytes du tissu cartilagineux. Les collagénases quant à elles sont des enzymes qui agissent en dégradant le collagène présent dans la matrice extracellulaire (Oseni et al., 2013), bien qu'un excès de collagénase pourrait réduire l'activité et la viabilité des chondrocytes (Dong et al., 2021).

#### 2.2.2.1. *Digestion du cartilage*

Après le lavage au PBS 1X à froid, les tissus découpés sont mis dans une bouteille 250 ml, dans laquelle on ajoute environ 15 à 20 ml de pronase avant de mettre dans le bain-marie à secousse thermostatique porté à 37°C pendant 1 h. Après cette première digestion, on ramène notre la bouteille dans la hotte pour faire un lavage 2 fois au PBS 1X avant d'ajouter 15 à 20 ml de collagénase pour une seconde digestion au bain-marie à secousse thermostatique réglé à 37°C jusqu'au lendemain.

#### 2.2.2.2. *Digestion de la membrane synoviale*

La façon de procéder est quasi identique que précédemment à la seule différence qu'au lieu de la pronase, nous incubons nos morceaux de graisse plutôt avec environ 13 à 15 ml de trypsine/EDTA 2,5 % pendant 1 h au bain-marie à secousse thermostatique porté à 37°C pendant 1 h, car la membrane synoviale encore appelée la synoviale est un tissu entouré en majorité de graisses et de fibres élastiques qui tapissent l'intérieur des articulations (Mathiessen & Conaghan, 2017). Et après le lavage au PBS 1X, nous incubons à la collagénase pendant 6 h.

#### 2.2.3. Incubation des cellules

L'incubation des cellules repose sur l'adhésion des cellules dans des micro-puits se trouvant dans le flacon T75 et leur prolifération caractérisée par l'apparition de filaments après au moins une semaine de culture. Ce stade est généralement appelé stade de confluence. Après la digestion réalisée par la collagénase, les tissus dissous sont transférés dans un tube falcone de 50 ml et centrifugés à 15000 tr/min pendant 5 min, s'en suit la séparation du surnageant contenant la solution de collagénase et le culot contenant nos cellules et quelques débris. Le culot est par la suite subi une série de deux lavages consécutifs avec 10 ml de PBS normal suivie de la centrifugation à 15000 tr/min pendant 5 min avant d'être suspendu avec 10 ml du milieu de culture DMEM 10X

, pour enfin être transféré dans un flasque T75 pour cellules adhérentes renfermant au préalable 20 ml de DMEM 10X.

#### 2.2.4. Changement du milieu de culture et examen de la confluence

Au courant de la semaine de culture, un ou deux changements de milieu de culture peuvent s'opérer pour favoriser la croissance de manière saine et optimum des cellules. Cette étape est généralement accompagnée d'une évaluation du stade de la confluence qui est souvent estimée en pourcentage.

##### 2.2.4.1. *Le changement de milieu de culture*

Il est basé sur fait de débarrasser le milieu usé des cellules et apporter un milieu frais. Pour ce faire, on utilise parfois comme indicateur la couleur du milieu se trouvant dans le flasque avant d'effectuer le changement de milieu. En effet, le DMEM est une solution qui est de couleur rouge, lorsque cette couleur vire du rouge au jaune en passant par la couleur orange, elle renseigne sur une consommation des éléments nutritifs contenus dans le milieu et un rejet des composés toxiques dans le milieu par les cellules. Ce qui entraîne une diminution de la basicité du milieu, reflétée par la couleur rouge au profit d'une augmentation de l'acidité du milieu reflétée par la couleur orange, voire jaune. À ce stade, un changement de milieu est recommandé pour favoriser une meilleure croissance des cellules.

Le changement de milieu se déroule sous la hotte, à l'aide des pipettes de 25 ml. Tout le milieu contenu dans les flasques en culture est enlevé et remplacé par un milieu frais ou non usé de DMEM 10X préalablement porté à 37°C pour ne pas aggraver les cellules sorties de l'incubateur à 37°C aussi. Par ailleurs, un lavage des cellules peut s'opérer au premier changement de milieu afin de débarrasser des impuretés dues à la digestion se trouvant dans le surnageant. Ce lavage se déroule entre deux à trois jours après la mise en culture et se fait uniquement une fois au cours de la culture à l'aide du PBS 1X. Lorsqu'il est constaté la présence des cellules flottantes dans le surnageant ou milieu usé, ce dernier peut être récupéré afin de mettre en culture dans un autre flasque.

##### 2.2.4.2. *L'examen de la confluence*

Il est basé sur une estimation en pourcentage de la quantité et la qualité de la prolifération des cellules. La quantité fait référence à la croissance caractérisée par une expansion des cellules dans le flasque. Tandis que la qualité fait référence à l'adhérence dans les puits et à l'étalement des cellules renseignant sur l'état de confluence.

L'évaluation du pourcentage de confluence varie entre 0 et 100 % (avec 100 % étant le stade maximal de confluence). Généralement à ce stade au bout d'une semaine de culture, on peut stopper la culture et passer à la mise en plaques de nos cellules, sinon poursuivre encore la culture pour une semaine supplémentaire jusqu'à atteindre environ 75 % ou 80 % de confluence pour les cellules qui ne croissent pas rapidement.

#### 2.2.5. Le passage des synoviocytes

Pour la culture des synoviocytes, lorsque celles-ci atteignent l'état de confluence, il est nécessaire de les faire subir un passage afin d'optimiser leur croissance.

Le passage des synoviocytes est un procédé de culture cellulaire qui comprend la trypsinisation, le comptage des cellules et le réensemencement des cellules dans plusieurs flasques et qui vise à favoriser non seulement la multiplication des synoviocytes, mais aussi, la différenciation cellulaire. En effet, au cours du passage, les fragments de tissus synoviaux non digérés vont former des excroissances de cellules synoviales (passage 0) qui vont ensuite évoluer vers un stade cellulaire différencié avec diverses morphologies comme la forme en fuseau et/ou la forme étoilée (passage 1) pour devenir finalement des cellules indifférenciées, où les synoviocytes auront toutes une morphologie fusiforme (passage 5) (Manferdini et al., 2016). Le passage de ces cellules favorise aussi l'élimination d'autres cellules contenues dans la synoviale dont les macrophages.

##### 2.2.5.1. *La trypsinisation*

Cette technique basée sur le détachement des cellules adhérentes des flasques par clivage enzymatique de la trypsine (Das et al., 2014).

Pour réaliser la trypsinisation, nous ramenons le flasque confluent de l'incubateur sous la hotte, puis nous le vidons du milieu de culture DMEM 10X qu'il contient, ensuite nous faisons un lavage avec 10 ml de PBS 1X pour enlever les traces du milieu. Après le lavage, nous passons à la trypsinisation où nous introduisons 5 ml de trypsine/EDTA 0,05 % dans le flasque et nous le portons en incubation à 37°C pendant 5 minutes. La trypsine/EDTA 0,05%, va permettre le détachement des cellules dans les puits et favoriser leur isolation parfaite dans le surnageant. En effet, les ions calcium et magnésium renforcent l'adhérence de cellule à cellule dans les cultures de cellules adhérentes et empêchent la trypsine d'agir et de séparer les cellules en masquant les liaisons peptidiques. L'EDTA, en tant qu'agent chélatant aux propriétés dissociatives douces, est

donc associé avec des solutions de trypsine pour augmenter l'efficacité de celle-ci en neutralisant les ions calcium et magnésium (Sutradhar et al., 2010).

Au bout de 5 minutes d'incubation, nous récupérons les cellules déliées en introduisant 5 ml de DMEM 10X dans le flasque, puis nous le vidons dans un tube falcone de 50 ml. Nous rinçons le flasque par la suite avec de nouveau 5 ml de DMEM 10X et nous prélevons la solution et l'introduisons dans le tube falcone qu'on va faire centrifuger ensuite pendant 5 min à 15000 tr/min. Puis, nous nous débarrassons du surnageant et remettons le culot en suspension avec 10 ou 20 ml du DMEM 10X avant de passer au comptage cellulaire.

#### 2.2.5.2. *Le comptage et mise en plaque des cellules*

Le comptage ou numération cellulaire consiste à déterminer le nombre exact de cellules contenues dans un flasque à l'aide d'un hématimètre. Le résultat obtenu est exprimé en unité d'événements par unité de volume (nombre de cellules / ml) sera nécessaire pour estimer le nombre de puits ou de plaques dans lesquelles nous allons introduire les cellules.

Aussitôt après avoir suspendu le culot lors de la trypsinisation, un volume de 20  $\mu$ l est prélevé et mélangé avec 20  $\mu$ l de bleu Trypan dans un tube Eppendorf. Puis ce mélange est introduit dans les deux chambres de l'hématimètre monté de la lamelle couvre objet, ensuite porté au microscope pour le comptage.

Le bleu Trypan est un colorant soluble dans l'eau, utilisé pour le test de viabilité des cellules, en ce sens qu'il est capable de traverser la membrane plasmique des cellules mortes par diffusion passive ou en s'infiltrant dans les membranes endommagées pour les colorer en bleu (Babakhanova et al., 2022).

Nous comptons les cellules contenues dans les 9 carrés des deux chambres avec un appareil spécialisé et nous faisons la moyenne des résultats obtenus pour avoir un nombre moyen de cellules comptées au total. Ce nombre est ensuite extrapolé au volume total pour estimer la concentration à l'aide d'une formule suivante:

$$\text{Nombre cellules/ ml} = \frac{\text{Nombre moyen de cellules comptées} * \text{facteur de dilution} * \text{Volume des chambres (10}^4 \text{ ml)}}{\text{nombre de carré compté (9)}}$$

Une fois le calcul achevé, nous multiplions le nombre obtenu, par le volume total de la suspension des cellules (20 ml). Ce qui permet d'obtenir le nombre final des cellules qui se trouvait dans le flasque. À partir de cette concentration finale, nous pouvons déduire le volume nécessaire pour introduire environ 350 milles cellules dans chaque puits de la plaque de 12, en nous basant aussi sur la densité du flasque où ces cellules ont été extraites.

Dès que les cellules sont mises dans les plaques, nous les portons à incubation à 37°C jusqu'à obtention de la confluence, soit pendant 24 à 48h. Des changements de milieu de culture peuvent intervenir une à deux fois durant l'incubation.

#### 2.2.6. Les procédés de traitement des cellules

Il s'agit de toutes les préparations qui sont faites en amont pour effectuer des tests sur les cellules et par la suite observer la réaction des celles-ci en aval. Ces préparations sont la privation et la stimulation des cellules.

##### 2.2.6.1. *La privation des cellules*

La privation des cellules consiste à réduire la quantité d'éléments nutritifs apportés aux cellules afin d'y créer un état de stress dans les cellules en culture. Il s'agit de faire passer la concentration du FBS dans un milieu de culture de 10% à 2,5 %.

##### *Préparation du milieu de privation des cellules*

La préparation du milieu de privation DMEM 2,5% est presque identique à celle du 10% à la seule différence qu'ici nous ajoutons plutôt un quart du volume de de 50 ml FBS dans le milieu DMEM normal (12,5/500), avant de l'enrichir avec 5 ml d'antibiotique P/S.

##### *Changement de milieu*

À l'aide d'une pipette de 5 ou 10 ml, nous prélevons tout le milieu DMEM 10% se trouvant dans les puits et le remplaçons par 2 ml du DMEM 2,5 %.

### *Surveillance du stress cellulaire*

La privation des cellules dure 48 h. Au bout de ce temps, nous pouvons observer au microscope une surbrillance de certaines cellules avec des enveloppes ayant une forme crénelée. Ces aspects servent de signes révélateurs du stress de cellules. Cependant, aucun changement de couleur ne doit être observé dans le milieu qui doit toujours garder son indicateur au rouge.

#### *2.2.6.2. La stimulation des cellules*

Le traitement offert aux chondrocytes consiste à les stimuler par une cytokine, l'IL-1 $\beta$ . En fait, la stimulation est un stress *in vitro* qu'on apporte aux cellules pour mimer l'environnement inflammatoire qui a lieu au cours de l'OA.

Les cellules de chaque puits seront donc stimulées par un volume équivalent d'IL-1 $\beta$  (100 mg/ml) selon deux modes de cinétiques qui dépendent de la dose (dose-dépendant) et du temps (time-dépendant).

#### *Stimulation dose-dépendante*

Au cours de cette stimulation, des quantités croissantes d'IL-1 $\beta$  en milligrammes (mg) sont administrées successivement aux cellules à savoir 0; 1; 5; 10; 25; 50; 100 et 200 mg, le dernier jour de la privation. Pour ce faire, un volume déterminé d'IL-1 $\beta$  est réparti sur le milieu de privation recouvrant nos cellules dans les puits. Après la stimulation, les cellules sont incubées pendant 24 h à 37°C.

#### *Stimulation temps-dépendante*

Ici, des concentrations de 100 pg/ml d'IL-1 $\beta$  sont apportées aux cellules pendant 4 jours après la privation. Ces jours sont repartis en heures (h) de stimulation à savoir 72 h; 48 h; 24 h; 12 h ou le lendemain; 8 h; 4 h, 2 h, 1 h; et 0. En effet, au bout de 48 h de la durée de privation, un volume de 4  $\mu$ l (plaque de 12 puits) d'IL-1 $\beta$  est déposé et reparti dans les puits sur le milieu de privation recouvrant nos cellules.

#### *2.2.6.3. Arrêt de la réaction de stimulation*

Cette opération consiste à retirer le milieu de privation des cellules par lavage au PBS à froid dans le milieu ambiant. Elle a lieu au temps 0 de stimulation pour le temps-dépendant et après 24 h pour la dose-dépendant.

Les plaques stimulées sont ramenées dans le laboratoire et le milieu recouvrant les cellules est complètement enlevé de chaque puit à l'aide de la micropipette de 1ml sans toucher les cellules qui sont tapissées au fond des puits. Puis, il est déposé dans des tubes Eppendorf ou cryotubes de 1.5 ml pour être conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ce milieu contient aussi une partie des métabolites explorés et servira à cet effet pour d'autres tests. Ensuite, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS normal à froid ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Dès lors, elles sont prêtes pour la lyse.

En outre, il peut arriver qu'on réutilise le liquide de lavage pour récupérer à l'aide de la centrifugation les cellules qui ont été enlevées par le lavage.

### **2.3. Le test de prolifération cellulaire**

Le test MTT est l'une des méthodes les plus efficaces pour vérifier la viabilité de la lignée cellulaire et évaluer la dose exacte et efficace d'un médicament. Le test MTT est un test colorimétrique permettant d'évaluer la cytotoxicité ou l'activité cytostatique. Dans des conditions définies, les enzymes oxydoréductases cellulaires dépendantes du NADPH reflètent le nombre de cellules viables. Le MTT pénètre dans les cellules et passe dans les mitochondries, cette enzyme réduit le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5 Diméthyl thiazol-2-Yl) -2,5-Diphényltétrazolium) en un produit formazan insoluble (il s'agit d'un produit chromogène artificiel formé par la réduction du sel de tétrazolium par la déshydrogénase et la réductase) qui a une couleur violette. Les cellules sont solubles dans des solvants organiques comme le DMSO, l'isopropanol acidifié seront les solvants pour rendre soluble le formazan insoluble. La couleur obtenue sera traitée pour la densité optique et les données obtenues seront lues (van Meerloo et al., 2011).

#### **2.3.1. Configuration de la plaque**

Nous avons mis des cellules dans des plaques de 96 puits en raison de  $1 \times 10^4$  cellules/puits. Les plaques étaient à fond rond et les cellules ont été disposées en trois exemplaires de 8 puits dans une plaque pour minimiser la variabilité des résultats. Nous avons laissé les cellules adhérer dans les puits pendant 24 h dans un incubateur contenant 5% de  $\text{CO}_2$  à  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.3.2. Traitement des cellules**

Nous avons préparé 5 doses de dilution croissante du 12-HETE 0,01 à  $1 \mu\text{M}$  (micromolaire) pour chaque exemplaire de cellules et avons distribué un volume de 25  $\mu\text{l}$  de préparation dans chaque

puits. Nous avons laissé le produit interagir avec les cellules pendant 24 h dans un incubateur contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 2.3.3. Incubation de la MTT

Au terme de l'incubation, nous avons ajouté un volume 1:10 de solution de MTT (5 mg/ml), c'est-à-dire 10 µl dans chaque puits. Puis nous avons agité les plaques pendant environ 5 min. Ensuite, nous avons incubé la plaque pendant encore 3 h à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub>.

### 2.3.4. Dissolution des cristaux

Pour cette étape, nous avons ajouté 150 µl de DMSO à chaque puits et avons mélangé la suspension jusqu'à ce que tous les cristaux aient été dissous. Puis nous avons recouvert la plaque entière avec du papier aluminium pour empêcher la lumière blanche d'interférer avec le produit photosensible qui se forme avant de ranger notre plaque dans un coin sombre et nous avons attendu environ 30 min avant la lecture de la densitométrie (DO).

### 2.3.5. Lecture de la DO

La lecture s'est faite au spectrophotomètre à 590 nm. Les valeurs obtenues ont été copiées dans une feuille Excel pour déterminer ultérieurement le pourcentage de cellules vivantes en soustrayant la DO moyenne des puits contrôles à la DO moyenne des puits tests.

## 2.4. Le test de migration cellulaire

Le test de migration des cellules ou rayure-test est une technique rapide et peu coûteuse qui permet d'étudier la migration cellulaire in vitro. Cette technique est basée sur la formation d'une plaie par une rayure effectuée sur une monocouche de cellules confluentes, suivi de l'observation du déplacement des cellules situées aux abords de l'espace nouvellement créé par la rayure vers l'ouverture pour fermer la rayure et établir à nouveau des contacts entre cellules (Liang et al., 2007).

### 2.4.1. Passage des cellules

Pour réaliser le test de rayure, nous avons effectué un passage des cellules dans des plaques de 12 puits en suivant les étapes décrites précédemment comme la trypsinisation, le comptage et la mise en plaque des cellules, que nous avons ensuite incubées pendant 24 h à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub>, afin d'obtenir une monocouche de cellules confluentes dans les puits.

#### 2.4.2. Privation des cellules

Nous avons par la suite mis les cellules dans le milieu de privation en changeant le milieu de culture usuel DMEM 10X par un milieu moins concentré DMEM 2,5X. Ensuite, nous avons remis nos cellules en incubation pendant 48 h à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.3. Le test de rayure

Pour faire notre test et obtenir un point de repère dans nos puits, nous avons réalisé deux rayures qui se croisent au point central puits pour former une sorte de croix (X) avec un embout de pipette p1000. Puis, nous avons porté la plaque au microscope à rotation « Revolve Microscope » (Echo a Bico Company, San Diego, CA, É.-U) pour observer le positionnement et prendre des images. Ensuite, nous nous sommes débarrassés des débris flottants en changeant juste le milieu de privation usé par un autre milieu plus frais contenant 12.5 ml de FBS dilué dans 500 ml de DMEM 1X.

#### 2.4.4. Traitement des cellules et capture d'images

Nous avons préparé des dilutions de notre produit comprises entre 0 et 5 µM que nous avons répartis dans chaque puits correspondant et laissé les plaques en incubation pendant 24 h. La prise de photos s'est faite pendant 3 jours successifs à la même période. Et les images ont été sauvegardées dans Dropbox puis transférées dans une clé USB pour analyse ultérieure.

### 2.5. Quantification des protéines

#### 2.5.1. Lyse des cellules

La lyse cellulaire est basée sur l'action des substances chimiques contenues dans une solution appelée tampon de lyse qui vont agir sur la membrane cytoplasmique des chondrocytes en éclatant les protéines et en la déstabilisant pour libérer des molécules d'intérêts enveloppées dans le cytoplasme.

##### 2.5.1.1. Préparation du tampon de lyse

Nous préparons une solution de 10 ml de tampon de lyse, pour ce faire, nous introduisons des volumes de 200 µl de Tris pH 7.4; 1 ml de NaCl; 20 µl d'EDTA pH 7.4; 500 µl de SDS dans un tube conique de 15 ml. Puis nous vortexons le mélange. Ensuite, nous pipetons la moitié de ce mélange que nous mettons dans un autre tube conique vide de 15 ml que nous plaçons

immédiatement à -200C. Dans la 2e moitié, nous ajoutons 50 µl de PMSF et 200 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéases, puis nous vortexons à nouveau et le déposons dans de la glace.

#### 2.5.1.2. *Ajout du tampon de lyse dans les cellules*

Nous enlevons au préalable, le PBS 1X utilisé pour arrêter la réaction de stimulation sur les cellules. Ensuite nous introduisons un volume de 200 voire 250 µl de tampon lyse sur les cellules se trouvant dans les puits de la plaque, puis nous laissons incuber pendant 5 à 6 minutes en les secouant à la main, ensuite nous faisons une inclinaison de 40 degrés avec la plaque pour récupérer les cellules mélangées au tampon, les mettre dans un tube Eppendorf pour le puits correspondant et les laisser dans la glace ou les conserver à -200C si on ne poursuit pas le processus.

En outre, il arrive très souvent qu'on observe une sorte de viscosité après la lyse. Cette viscosité reflète la chromatine condensée et fait office d'un indicateur d'une bonne lyse cellulaire.

#### 2.5.2. Sonication des protéines

La sonication, définie comme étant l'application d'ondes sonores de type ultrason à travers un milieu liquide, rompant les adhésions intercellulaires, est une technique qui permet entre autres de décondenser et de lyser les protéines d'adhésion cellulaire (Erivan et al., 2018). Il s'agit en fait de détacher les filaments de chromatine en faisant passer l'échantillon dans la sonde du sonicateur pendant quelques secondes afin de libérer les protéines d'intérêts encastrées dans des complexes protéiques et d'accroître le processus de lyse des cellules.

Nous commençons par nettoyer le sonicateur en entier et surtout la sonde d'abord par de l'alcool à 70% et ensuite par l'eau distillée à l'aide d'un papier absorbant. Une fois la sonde nettoyée, nous réglons l'amplitude du sonicateur à 50 et nous introduisons la sonde dans notre tube jusqu'au 2/3 sans toucher les parois du tube, puis nous allumons le pulse et le maintenons jusqu'à la fin du décompte de 15 secondes. Ensuite nous encapuchonnons notre tube et le déposons dans de la glace et passons au tube suivant. Au terme de la sonication, on sentait une surchauffe du tube.

#### 2.5.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est basé sur la détermination de la teneur en protéine d'un échantillon par la lecture de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre et la déduction de la masse de l'échantillon à partir du sérum d'albumine de Bovin (BSA) utilisé comme standard

Le dosage des protéines est un long processus qui nous permet de déterminer la teneur en protéines de nos lysats. Ce procédé renferme plusieurs étapes qui sont les suivantes:

#### *2.5.3.1. La fragmentation de la chromatine*

Au niveau cellulaire, l'accès aux protéines passe par la dénaturation de la chromatine. En fait, la chromatine est une structure nucléoprotéique formée de protéines histones enroulant l'ADN, détenteur de l'information génétique des cellules (Corpet, 2020). Pour fragmenter la chromatine, nous chauffons les tubes dans une plaque chauffante à 100°C pendant 5 min. Le fait de chauffer les protéines sert à les désorganiser la structure protéique de la chromatine pour libérer les liaisons peptiques entre acides aminés et exposer les charges des protéines. Ainsi dans la migration des protéines pendant le Western blot, le SDS va favoriser le maintien de l'état des protéines en forme déliée par attraction polaire, ce qui les permettra de migrer non pas par la charge, mais, par le poids moléculaire.

#### *2.5.3.2. La purification des protéines*

Purifier une protéine est le fait de la débarrasser de toute sorte d'impureté. De fait, nous faisons une centrifugation pendant 5 min à 15000 tr/min des tubes, ensuite nous récupérons le maximum de surnageant possible dans de nouveaux tubes pour le séparer du culot qui contient des impuretés (collagène, débris de cartilage, etc.). À cette étape, les tubes peuvent être conservés à -200°C ou alors passer directement la quantification.

#### *2.5.4. La quantification*

La quantification des protéines est basée sur le principe du dosage de l'acide bicinchoninique (BCA) qui stipule qu'après la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$ , deux molécules de BCA chélatent avec chaque ion  $\text{Cu}^{+}$  résultant en la formation d'une couleur pourpre intense qui absorbe à 560 nm. (<https://www.creative-diagnostics.com/Sample-Gel-Preparation.htm>).

Pour ce faire, nous utilisons un gramme étalon le BCA (Thermofisher Scientific™) préparé à une concentration de 1 mg/ml qui va nous servir de standard. Puis utilisons une microplaque de 96 puits pour répartir des volumes de la gamme et nos échantillons avec les autres réactifs qu'on associe à la quantification à savoir le tampon de lyse et les réactifs du substrat du kit. Les protéines sont dosées à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm. Et les résultats obtenus

sont par la suite photographiés, ou imprimés ou importés dans un fichier Excel servant à établir la courbe de déviation standard.

Cette technique a pour avantage d'offrir une plage linéaire large, peu couteuse, hautement reproductible, sensible et facile à utiliser. Mais, son inconvénient est qu'elle nécessite une courbe standard pour chaque lecture et la couleur bien qu'elle se développe au fil du temps, reste stable pour la mesure après 30 minutes à 37 °C.

## **2.6. Western blot**

Le Western blot ou « immunoblotting » ou encore transfert Western est une technique basée sur la répartition des protéines selon la charge égale, leur séparation en fonction du poids moléculaire, le transfert électrophorétique vers une membrane appropriée et la révélation des anticorps (Gavini & Parameshwaran, 2022).

En effet, les principes de base du Western blot sont l'électrophorèse des protéines et l'ELISA. L'électrophorèse est une méthode couramment utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur taille, de leur forme ou de leur charge. Tandis que l'ELISA est de type indirect, car il utilise des anticorps primaires anti-protéines spécifiques pour sonder la protéine échantillon, puis un anticorps secondaire marqué pour une visualisation plus poussée (Kurien, 2021)

### **2.6.1. La préparation du gel**

La préparation du gel est une technique qui repose sur l'addition de divers solvants ayant pour résultat final la solidification du mélange formé au bout d'un certain temps d'observation. En effet, le gel d'électrophorèse est composé de deux phases à savoir la phase de séparation ou de résolution et la phase de condensation ou d'empilage ou de « stacking ». Le gel d'empilement a une densité inférieure, en faisant d'abord passer les échantillons à travers ce gel, les protéines sont concentrées en quelques minutes dans une zone de départ mince aussitôt que le contenu de l'échantillon atteint le gel de résolution par un processus connu sous le nom d'isotachophorèse. L'interface entre les deux densités de gel peut donc être considérée comme la ligne de départ de toutes les protéines de chaque puits et en entrant dans le gel de résolution, les protéines commencent à se séparer en fonction de leur taille.

#### *2.6.1.1. Préparation des solutions*

Deux solutions de gels correspondants aux deux phases sont utilisées pour le Western blot. Lors du montage dans les plaques de migration, la solution du gel de séparation se coule avant celle du « stacking » qui elle va se trouver au-dessus de la précédente à la fin du coulage.

La préparation de la solution du gel de séparation débute par le pipetage d'un volume d'eau distillée, ensuite le tampon 4X Tris Cl/SDS pH 8.8, puis l'acrylamide. En fait, cette préparation nécessite un volume de 15 ml pour deux gels, car un volume de 7.5 ml environ sera réparti dans chaque plaque. La préparation de la solution du gel du « stacking » quant à elle nécessite un volume total de 5 ml où on va répartir 2.5 ml par plaque. Les mêmes réactifs, sauf pour le tampon Tris qui sera celui du pH 6.8, seront ajoutés dans un tube de 15 ml et dans le même ordre.

Les solutions d'APS et de TEMED seront ajoutées juste avant le coulage dans les plaques de migration, car ils agissent comme des agents solidifiant du gel.

Il est à noter que les volumes des réactifs qui entre dans la préparation des gels varient en fonction de la concentration du gel qu'on souhaite préparer qui est souvent fonction du poids moléculaire de la protéine qu'on recherche, ce qui répond au principe selon lequel les protéines de fort poids moléculaire nécessitent un gel de faible concentration tandis que les protéines de faible poids moléculaire nécessitent un gel de forte concentration.

#### *2.6.1.2. Montage des plaques*

Le kit de montage des plaques des gels utilisé dans le cadre de nos travaux est celui du « Mini-PROTEAN System » du fabricant Bio-rad®. Ce kit est constitué entre autres d'une cassette, des peignes en occurrence de 15 ml comptant 10 puits qui sont ceux que j'ai le plus utilisés, un caoutchouc d'étanchéité et des plaques en verre en occurrence de 10 ou 15 ml et un support des plaques. Le montage des plaques se fait toujours en double, car une cassette de Western blot est toujours constituée de deux gels. Après le montage des plaques, un test est fait avec de l'eau distillée pour s'assurer de l'étanchéité du dispositif afin d'éviter les fuites de liquide. Ce test dure environ 5 à 10 minutes.

#### *2.6.1.3. Coulage des gels dans les plaques*

Une fois les plaques montées et les solutions de gel préparées sans agents solidifiant, nous procédons à l'ajout des volumes déterminés de l'APS et du TEMED au préalable dans la solution

du gel de séparation. Puis nous passons le mélange au vortex, ensuite nous répartissons à l'aide d'une pipette le volume en deux parts pour chaque plaque du montage comme évoqué ci-dessus et enfin, nous ajoutons 1 ml d'alcool 70% sur chaque solution. L'alcool va nous permettre d'observer la différence de phase entre la partie solidifiée en dessous et la partie liquide (alcool) au-dessus après une certaine durée qui est généralement fonction de la quantité d'agents solidifiant inclus dans la préparation (5 à 7 minutes dans mon cas).

Dès que le gel de séparation a solidifié, nous procédons à l'ajout de la solution du gel de « stacking » en nous débarrassant d'abord de l'alcool en inclinant le support d'un côté vers un réceptacle et en enlevant l'excédent avec un papier absorbant, puis nous ajoutons des volumes déterminés de l'APS et du TEMED pour le « stacking », nous passons le mélange au vortex, ensuite nous répartissons à l'aide d'une pipette le volume en deux parts pour chaque plaque du montage comme précédemment et enfin, nous enfilons les peignes au-dessus de chaque plaque en les plongeant dans les solutions de « stacking ». Un temps qui varie entre 5 à 10 min pour la solidification du « stacking » gel. Pendant que le « stacking » se forme, pour gagner un peu de temps, nous entamons la préparation des échantillons.

### 2.6.2. La migration des protéines

Les protéines sont de grosses molécules avec charge, elles peuvent migrer dans les gels de polyacrylamide sous champ électrique. La vitesse de migration dépend du poids moléculaire des protéines : les protéines lourdes se déplacent plus lentement que les protéines légères (Kurien, 2021). Avant de faire migrer les protéines, nous procédons d'abord à la préparation des échantillons dans des tubes Eppendorf, ensuite nous procédons au dépôt dans des puits des gels et enfin nous les faisons migrés dans des cuves par électrophorèse.

#### 2.6.2.1. La préparation des échantillons

Il s'agit de préparer un cocktail constitué des protéines quantifiées, d'eau distillée et de solution de bleu diluée 6 fois (6X) dans un tube Eppendorf pour chaque échantillon et un tube pour le marqueur taille ou marqueur de poids moléculaire qui aura les mêmes composants sauf les protéines, mais, plutôt un volume de marqueur de taille à la place. À l'aide d'une table de conversion confectionnée sur fichier Excel, nous déterminons les quantités de protéines en microgramme par microlitre des échantillons que nous avons obtenus après la quantification. Dans cette table nous déduisons aussi les quantités d'eau distillée et de bleu 6X que nous allons introduire dans notre cocktail. La solution

de bleu 6X est constituée du mercaptoéthanol qui se fixe aux protéines et les sépare en des sous-unités complexes. Une fois les cocktails constitués, nous les mettons à chauffer dans une plaque chauffante à 100°C pendant 5 min, puis nous les centrifugeons à 15000 tr/5 min. Cependant, les échantillons apprêtés peuvent être stockés à 40°C jusqu'au lendemain.

#### 2.6.2.2. *Dépôt des échantillons*

Une fois le décompte pour la formation de « stacking » est atteint, nous vérifions si les gels ont solidifié convenablement, puis nous récupérons les gels en les gardant imbriqués entre les deux faces de verre, ensuite nous enlevons les peignes et les excès de gels sur le côté extérieur des deux faces en verre et nous introduisons les plaques de verre dans la chambre de coulée multiple. Enfin, nous remplissons la chambre de coulée avec le tampon de migration en s'assurant que les plaques de gels soient plongées entièrement dans le tampon. Dès lors que les gels se trouvent dans le tampon de migration, il ne nous reste qu'à déposer les échantillons dans les puits dessinés par les peignes qui ont à l'occasion une contenance totale de 50 µl. En effet, le dépôt des échantillons se fait suivant l'ordre croissant de stimulation des cellules que ce soit en fonction du temps ou de la dose. À l'aide des embouts à longs tuyaux, nous prélevons d'un coup toute la solution contenue dans l'Eppendorf par échantillon que nous introduisons délicatement au fond des puits et nous remontons lentement au fur et à mesure que le puit se remplit jusqu'à ce que l'embout se vide complètement. Nous agissons ainsi pour chaque tube et veillant à ce que le tube pour le marqueur de poids moléculaire se trouve toujours au premier ou au dernier puits de chaque gel.

#### 2.6.2.3. *Électrophorèse des protéines*

La migration des échantillons se fait par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) à 100 volts pendant environ 1h30 à 2 h. En effet, le type d'électrophorèse le plus courant utilise des gels de polyacrylamide et des tampons chargés de SDS. La procédure de SDS-PAGE est basée sur les caractéristiques de la SDS, qui est un détergent fortement anionique. Parce que les protéines n'ont pas toutes la même charge électrique, le mélange est traité avec SDS, et ainsi les protéines deviennent dénaturées et chargées négativement. En conséquence, cela permet la séparation des protéines par poids moléculaire (Jensen, 2012).

Ainsi, lorsque le dépôt est achevé, nous posons le couvercle au-dessus du réservoir de la chambre de coulée en fixant les bornes du couvercle sur les électrodes correspondant sur la chambre, ensuite nous connectons les électrodes du couvercle à la source d'alimentation d'énergie et enfin nous

réglons la source au paramètre requis et nous démarrons la migration. Une autre technique de migration consiste à lancer le processus à 70 volts et à augmenter le voltage de 10 unités toutes les 10 minutes jusqu'à atteindre 100 volts et laisser le temps restant s'écouler avant d'arrêter la migration.

Une étape critique de ce processus est d'observer l'évolution de la frange de migration décrite ici par la ligne horizontale formée par la solution bleue mélangée à nos protéines et aussi la répartition du marqueur de poids moléculaire dans le gel qui est un élément important pour l'identification des bandes de notre protéine d'intérêt. En effet, une bonne migration est obtenue lorsque le marqueur de poids moléculaire est bien développé de façon à ce que toutes les différentes tailles puissent être distinguées dans le gel. Cela se fait par une observation minutieuse de la dernière bande du marqueur qui est souvent de 10 kDa (kilo Dalton). Cette observation précède le plus souvent l'arrêt de la migration.

### 2.6.3. Le transfert des protéines

Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines séparées peuvent être transférées de l'intérieur du gel sur une membrane (un transfert Western) faite de nitrocellulose. La nitrocellulose est la membrane la plus couramment utilisée. L'électroblotting est la procédure utilisée pour transférer des protéines d'un gel à une membrane. Ce processus fait usage d'un courant électrique pour passer les protéines du gel vers la membrane. Il est réalisé par immersion d'un sandwich gel-membrane (transfert humide). L'efficacité du transfert de protéines dépend du type de gel utilisé, de la masse moléculaire de la protéine et du type de membrane (Jensen, 2012).

Le transfert des protéines est une procédure qui comprend la préparation du tampon de transfert, l'incubation des membranes de transfert, le montage du sandwich et le transfert proprement dit.

#### 2.6.3.1. *La préparation du tampon de transfert*

Le tampon de transfert est constitué du Tris-Base et de la glycine mélangés dans de l'eau distillée et du méthanol dans des proportions requises. Le méthanol est généralement présent dans le tampon de transfert et aide à éliminer le SDS des protéines transférées à partir de gels de polyacrylamide dénaturants contenant du SDS. Il stabilise la géométrie du gel pendant le processus de transfert et tend à augmenter la capacité de liaison de la nitrocellulose (NC) pour les protéines et aide les

protéines à mieux se lier à la membrane de la NC (Kurien & Scofield, 2015). Le tampon de transfert, une fois préparé, est stocké à 40C afin de rester en bon état d'utilisation.

#### 2.6.3.2. *L'incubation des éléments de transfert*

Les éléments de transfert sont les éponges, une feuille de papier-filtre et la membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert. Des coupes de feuille de papier-filtre et la membrane de nitrocellulose sont réalisées selon les dimensions des motifs présents dans le laboratoire. Pour un Western complet, nous avons besoin de 8 coupes de papier « whaltpmann »; 2 coupes de membrane de nitrocellulose et 4 éponges. Par la suite, ces coupes avec les éponges seront immergées dans des cuves distinctes contenant du tampon de transfert avant d'être rangées dans le réfrigérateur ou dans la chambre froide à 40C. Nous avons aussi besoin des deux gels issus de la migration où à l'aide du couteau nous nous sommes débarrassés de la partie faisant office de « stacking » après la migration. Ces gels seront aussi introduits dans 2 cuves distinctes contenant environ 15 à 20 ml de tampon de transfert.

#### 2.6.3.3. *Réalisation du sandwich*

Pour permettre le déplacement des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose, un sandwich est réalisé. Ce sandwich se monte comme suit. Nous disposons des cuves contenant nos coupes selon l'alignement ci-après : une éponge- deux papiers « whaltpmann » -un gel- une membrane de nitrocellulose -deux papiers « whaltpmann » - une éponge. Près d'eux, nous disposons aussi un plateau ou une cuve contenant du tampon de transfert dans lequel va se monter le sandwich, il sera nécessaire pour faire submerger la cassette.

Après avoir rangé tout le matériel près de nous, nous ouvrons et déposons la partie en noir de l'une des deux cassettes du transfert dans notre cuve remplie au quart avec le tampon de transfert, puis nous déposons sur cette face noire de notre cassette une éponge aussi de couleur noire en s'assurant qu'elle ne déborde pas dans son réceptacle, puis nous posons deux papiers « whaltpmann » jumelés ensemble sur l'éponge en s'assurant qu'ils se positionnent un peu vers le bas de ce dernier, puis nous posons délicatement notre gel sur les deux papiers de façon à ce qu'il se trouve en équidistance avec les côtés de ces derniers en s'assurant que les bandes du marqueur de taille se trouve à notre droite et enfin nous posons délicatement notre membrane de nitrocellulose sur le gel de façon à ce qu'elle recouvre tout le gel aussi en le centralisant sur ce dernier. C'est à ce stade que nous repérons la présence des bulles d'air si jamais elles sont présentes. Rendu à cette étape, nous avons complété

la première partie de notre sandwich. La partie suivante du montage consiste à recouvrir tour à tour notre préparation par les éléments qui lui ont précédé au début du montage en commençant par les derniers éléments. Ainsi, nous posons délicatement sur la membrane deux nouveaux papiers « whaltnann » jumelés ensemble selon le même principe que précédemment qu'ils doivent recouvrir notre membrane, puis à l'aide d'une brosse roulante, nous enlevons les bulles d'air en la roulant délicatement sans exercer de pression sur la préparation en respectant le principe que les bulles doivent sortir du gel par l'extrémité la plus proche possible. Ensuite, nous posons une éponge de couleur blanche sur les papiers, puis refermons notre sandwich en retournant la face transparente de la cassette sur l'éponge blanche, puis nous soulevons notre sandwich en tenant la cassette par les extrémités afin de glisser délicatement la ceinture d'attache des deux faces de la cassette. Enfin, une fois notre sandwich monté, nous le déposons dans la chambre d'électrode que nous avons au préalable disposé dans le réservoir d'électrophorèse de façon que le côté ou la face rouge de cette dernière soit plus proche du bord latéral du réservoir que la face noire.

#### 2.6.3.4. *Déroulement du transfert*

Il comprend les parties suivantes : ranger les cassettes à l'intérieur, déposer le petit barreau aimanté en dedans, mettre notre bloc de glace, remplir avec le tampon et enfin fermer le réservoir et démarrer le transfert.

Pour effectuer le transfert, nous devons au préalable ranger les cassettes dans la chambre d'électrode en veillant à ce que la ceinture de la cassette soit dirigée vers le haut et que la face noire de celle-ci regarde celle de la chambre. Puis, nous devons introduire successivement le petit barreau aimanté et le bloc de glace dans le réservoir d'électrophorèse avant de le remplir avec le tampon de transfert dilué qui a servi à tremper les éponges et les autres éléments cités plus haut. Ensuite, nous allons transporter notre réservoir vers la chambre froide où nous allons le déposer sur l'agitateur magnétique, puis le remplir avec le tampon de transfert qui s'y trouve déjà avant de le couvrir avec le couvercle dont les bornes seront respectivement connectées à celles de la chambre d'électrodes. Une fois le réservoir fermé, nous allons connecter les câbles du couvercle à leur borne correspondante se trouvant sur la source d'alimentation, démarrer l'agitateur magnétique à la vitesse comprise à 100 tr/min et par la fin régler la source d'alimentation à 120 volts pour 90 min avant de la démarrer aussi.

Il est à noter le transfert commence avec un ampèremètre qui affiche une valeur qui se trouve généralement autour de 0,20 A pour un réservoir et nous devons veiller à ce qu'il n'atteigne ou ne dépasse pas 0,40 A, afin d'éviter de faire chauffer le milieu ce qui entraînerait une fonte probable du gel et un mauvais transfert par la suite. Une fois que l'on constate que la valeur de l'ampèremètre tend vers 0,4 A, nous devons baisser le voltage de 10 unités (de 120 à 110 volts) pour palier à ce risque.

#### 2.6.4. Révélation de l'expression d'anticorps

Au cours du Western blot, nous assistons à deux révélations à la suite du transfert. D'abord la révélation des protéines et ensuite la révélation de l'expression d'anticorps. Dépendamment du choix d'anticorps, nous pouvons être amenés à utiliser soit un anticorps polyclonal ou un anticorps monoclonal. En fait, les anticorps monoclonaux sont plus spécifiques, car ils ciblent un seul déterminant antigénique alors que les anticorps polyclonaux sont plus sensibles, car ils ciblent plusieurs déterminants antigéniques. Mais, de façon préférentielle, ce sont les anticorps monoclonaux qui nous employons le plus.

La révélation de l'expression d'anticorps est un processus qui vise à mettre en évidence la protéine d'intérêt présente sur la membrane. Pour cela, elle utilise une protéine (le lait 5%) ou par un détergent non réactif (superblock) pour bloquer les sites de liaison aux protéines afin de faciliter la direction de l'anticorps primaire contre un antigène spécifique et par la suite exposé le complexe formé à un anticorps secondaire lié à une enzyme dirigée contre l'anticorps primaire. Cet ensemble sera par la suite visualisé par luminescence par l'apparition d'une ligne interrompue noire sous un fond blanc sur la membrane (Gallagher et al., 2004).

##### 2.6.4.1. Révélation au rouge ponceau

La révélation des protéines se fait par la coloration au rouge ponceau et se déroule de la façon suivante. Aussitôt que le compte à rebours du transfert est achevé, nous portons notre réservoir de la chambre froide vers le laboratoire où nous allons démonter nos deux sandwichs près du robinet à eau distillée. Nous allons préparer deux cuves dans lequel nous allons remplir avec environ 20 ml de solution de rouge ponceau chaque, puis nous allons récupérer les membranes des sandwiches que nous allons immédiatement immerger dans ces solutions avec la face d'intérêt tournée vers le haut, pendant environ 30 secondes à une minute. Ensuite nous allons récupérer les solutions de rouge ponceau des cuves en inclinant celles-ci dans leur récipient de stockage tout en laissant la

membrane qui a adhéré dans la cuve, puis nous allons rapidement remplir un peu d'eau distillée du robinet sur les abords du gel dans la cuve pour enlever l'excès de colorant. Nous allons répéter cette action deux ou trois fois, puis nous allons prendre en photo nos membranes après avoir vidé l'eau de rinçage de la cuve avant de passer à la révélation d'anticorps.

#### *2.6.4.2. Révélation à base d'anticorps*

Cette étape passe par plusieurs d'autres procédés pour se réaliser. En effet, la révélation des d'anticorps dirigés contre nos protéines d'intérêts nécessite au préalable un blocage de la membrane, une incubation avec un anticorps primaire spécifique à notre protéine, une incubation à un anticorps secondaire conjugué à l'anticorps primaire suivi de l'ajout du substrat couplé à un fluorochrome et enfin une lecture avec prise des photos des membranes dans un transilluminateur.

##### *2.6.4.2.1. Blocage de la membrane*

Un lavage successif au TTBS 1X est nécessaire avant le blocage. Il s'agit de mettre environ 15 à 20 ml de la solution de TTBS 1X dans notre cuve, qu'on va ensuite déposer sur l'homogénéisateur en réglant la vitesse à 100 tr/min, attendre 5 min, puis nous allons nous débarrasser de la solution épuisée pour rajouter à nouveau 15 à 20 ml de TTBS 1X. Cette procédure sera répétée deux ou trois fois. Ensuite nous allons prélever 15 à 20 ml de solution superbloc et la mettre sur nos membranes puis on va laisser les membranes en incubation environ 45 min à 1 h.

##### *2.6.4.2.2. L'incubation à l'anticorps primaire*

Après le blocage, nous devons rincer nos membranes en faisant 2 lavages comme décrits précédemment. Puis nous allons préparer notre anticorps en faisant une dilution du stock dans la solution de superbloc dilué au 10% avec la solution de lavage TTBS 1X. Le ratio de la dilution pour l'anticorps primaire est fonction du fabricant. Généralement, nous préparons une dilution de 24 ml que nous répartissons dans nos gels (12 ml chaque), puis nous recouvrons la cuve avec du plastique avant de laisser incuber jusqu'au lendemain dans la chambre froide.

##### *2.6.4.2.3. L'incubation à l'anticorps secondaire*

Le lendemain nous continuons notre révélation en récupérant d'abord l'anticorps primaire dans le tube dans lequel il a été dilué avant de le garder dans le réfrigérateur à -200C. Puis nous faisons un lavage au TTBS 1X toutes les 10 min pendant 30 min à 1 h de temps. Pendant ce temps, nous préparons l'anticorps secondaire en nous basant sur les indications sur la notice afin de vérifier les

compatibilités (monoclonal ou polyclonale; lapin ou souris) avec la source et le taux de dilution indiqué par le fabricant. Une fois le lavage terminé, nous mettons un volume d'environ de 12 ml de l'anticorps secondaire préparé dans chaque membrane et nous incubons pendant 1 h à température ambiante sur l'homogénéisateur à une vitesse réduite par rapport à celle du lavage.

#### 2.6.4.2.4. *L'ajout du substrat*

Au bout d'une heure, nous effectuons à nouveau deux lavages au TTBS 1X pendant 5 min chaque. Durant le temps d'attente du lavage, nous apprêtons le substrat qui est constitué de deux réactifs, le luminol et le peroxyde que nous mélangeons à volume égal dans un tube falcone de 15 ml (1 ml chaque pour deux membranes) et nous rangeons hors de la lumière. Une fois le lavage terminé nous évacuons l'excès de solution de lavage puis nous déposons 1 ml du mélange sur chaque membrane, ensuite nous recouvrons toute la surface de la membrane avec le substrat pendant 2½ min soit 5 min pour les deux membranes simultanément. En effet, au cours de ce procédé, il se déroule la réaction d'oxydation du luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) par le peroxyde d'hydrogène catalysé par la peroxydase conjuguée à l'anticorps secondaire, ce qui forme un produit luminescent. Ce produit luminescent est détecté par le transilluminateur pendant un temps d'exposition déterminé.

#### 2.6.4.3. *La capture des images*

Le transilluminateur nous sert non seulement à observer les protéines séparées dans la membrane, mais aussi, à prendre des photos après la lecture. Au préalable, nous allumons l'appareil afin de laisser la caméra démarrer simplement, ensuite nous recouvrons les membranes dans du plastique transparent afin d'éviter qu'elles sèchent rapidement. Puis, nous entreposons notre préparation dans 2 couches de papier essuie-tout en passant l'un au-dessus pour enlever des bulles d'air si elles sont présentes. Ensuite, nous plaçons les membranes dans le plateau de l'appareil en les centralisant le plus possible. Enfin, nous programmons la lecture et nous attendons qu'elle se termine. Une fois achevée, nous sauvegardons les photos obtenues dans un dossier dont l'identification porte des détails essentiels de Western blot: le nom de l'anticorps utilisé et le taux de dilution, le code de l'échantillon, le pourcentage du gel, le nom et la dilution de la solution de blocage ainsi que celui du fabricant et la date de lecture.

Il peut arriver parfois que lors de l'interprétation, nous ne distinguons pas la position exacte de notre protéine d'intérêt, car le marqueur de taille n'est pas visible. De fait nous pouvons faire une

autre programmation afin de faire ressortir uniquement les bandes du marqueur de taille pour mieux interpréter nos résultats.

## 2.7. Histologie

Nous avons réalisé l'histologie sur des coupes de tissus provenant des cartilages sains et OA de l'humain et du chien fixés sur les lames en raison de 7 lames (3 sains et 4 OA) de chaque espèce pour 2 coupes par lames. En effet, cette méthode est utilisée pour la détection du cartilage, de la mucine et des granules de mastocytes sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine, et peut également être utilisée pour des coupes congelées. Le cartilage et la mucine sont colorés en orange ou en rouge et les noyaux sont colorés en noir sous un fond coloré en vert.

Les blocs histologiques ont été réalisés à l'aide du système de console d'enrobage « Tissue-Tek TEC™ 6 » (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). Les blocs ont été découpés en tranches de 5 micromètres à l'aide d'un microtome rotatif Leica®. Ils ont ensuite été placés sur des lames de verre histologiques et conservés dans l'incubateur pendant 48 h à 37°C.

Pour la coloration histologique, nous avons utilisé un protocole comprenant différentes étapes de lavage et de coloration, au cours desquelles les lames ont été traitées comme suit:

Tout d'abord, nous avons incubé les lames dans du xylène pendant 5 min à deux reprises. Les lames ont ensuite été lavées à nouveau dans de l'éthanol 100% pendant 3 min à deux reprises. Ensuite, un autre lavage avec de l'eau doublement distillée (ddH<sub>2</sub>O) pendant 2 min supplémentaires.

Les lames ont ensuite été colorées à l'hématoxyline Weigert 50% pendant 4 min, puis lavées dans ddH<sub>2</sub>O pendant 2 min, incubées dans du chlorure ferreux pendant 1 min, et enfin lavées dans ddH<sub>2</sub>O pendant 2 min supplémentaires.

La coloration Fast Green (Sigma-Aldrich®) a été réalisée en incubant les lames dans le colorant pendant 30 secondes, puis dans de l'acide acétique 1% pendant 5 secondes, suivi par de la safranine-O pendant 4 min supplémentaires.

L'étape finale consiste à laver les lames avec de l'éthanol 100% pendant 1 min, 3 fois, puis avec du xylène pendant 2 min, 2 fois. Les lames sont alors prêtes et sont recouvertes de lamelles de verre et collées.

## 2.8. Immunohistologie

L'immunohistochemie (IHC) ou immunocytochimie est une méthode de détection et de localisation d'antigènes spécifiques dans les tissus où les cellules, basée sur la reconnaissance antigène-anticorps visant à exploiter la spécificité d'un anticorps à se lier à son antigène au niveau de la microscopie optique (CARTUN et al., 2021). De fait, elle intègre à la fois des principes histologiques, immunologiques et biochimiques pour identifier des protéines spécifiques au niveau des tissus à l'aide de la réaction antigène-anticorps liée à un chromogène, ce qui permettra d'observer la distribution et la localisation des composants cellulaires protéiques ciblés à l'intérieur d'une cellule ou d'un tissu *in situ* (Pal, 2022). Bien que cette technique permette de détecter la présence *in situ* des protéines inflammatoires et d'autres métabolites impliqués dans l'OA, nous avons constaté que la révélation des protéines d'intérêts est quasi similaire à celui du Western blot.

La technique de l'IHC est un long processus qui se déroule de manière séquentielle en deux jours, dont les principales étapes sont: le déparaffinage, la réhydratation, le démasquage de l'antigène, le blocage, l'ajout de l'anticorps primaire pour le premier jour et l'ajout de l'anticorps secondaire, l'application du substrat ABC, l'application du chromogène, la contre coloration et le recouvrement des lames pour le deuxième jour (Magaki et al., 2019).

Il est à souligner ici que nous décrivons ici la méthode indirecte, car l'anticorps secondaire est marqué, contrairement à la méthode directe où l'anticorps primaire est marqué, ce qui permet non seulement l'amplification du signal, mais aussi l'utilisation de différents anticorps primaires.

### 2.8.1. Le déparaffinage

C'est une technique qui consiste à enlever la paraffine dans les tissus fixés sur une lame à l'aide de solvants précis. En fait, la paraffine qui sert à fixer les tissus sur des lames joue un rôle de protection de l'intégrité des tissus en ce sens qu'elle est aussi sorte de barrière pour la pénétration de certains solvants dans les tissus. Pour débiter notre IHC, nous devons nous débarrasser de cette couche afin de rendre nos tissus viables à des solvants, en procédant comme suit :

C'est une technique qui consiste à enlever la paraffine dans les tissus fixés sur une lame à l'aide de solvants précis. En fait, la paraffine qui sert à fixer les tissus sur des lames joue un rôle de protection de l'intégrité des tissus en ce sens qu'elle est aussi sorte de barrière pour la pénétration de certains

solvants dans les tissus. Pour débiter notre IHC, nous devons nous débarrasser de cette couche afin de rendre nos tissus viables à des solvants, en procédant comme suit :

Nous devons premièrement ranger les lames dans un portoir, remplir les bacs ou cuves de coloration avec environ 250 ml de solution de déparaffinage rangé dans un ordre précis à savoir trois solutions de xylène et trois d'alcools 100%, sous la hotte. Ensuite, régler le chronomètre à la durée maximale de la procédure qui est de 22 min. Par la suite, plonger tour à tour les lames dans un premier temps dans trois solutions de xylène I (7 min), II (5 min) et III (3 min), et dans un second temps les passer dans trois solutions d'alcool 100% I (3 min), II (3 min) et III (2 min).

### 2.8.2. La réhydratation

C'est une procédure qui consiste à rendre nos cellules absorbantes en faisant entrer de l'eau dans les tissus qui ont séché à cause de la durée de conservation, mais aussi, de remplacer les solvants de déparaffinage par l'eau dans les tissus. Nous la réalisons en plongeant notre portoir de lames issues de la solution d'alcool III directement dans un bac contenant environ 250 ml d'eau distillée sans aucun temps d'interruption après le déparaffinage. Et nous attendons environ 2 min avant de passer à l'étape suivante.

### 2.8.3. Le démasquage des antigènes

Le démasquage des antigènes aussi appelé récupération d'antigènes est un prétraitement des tissus visant à rendre accessibles les antigènes masqués par la fixation afin de permettre la liaison aux anticorps via leurs épitopes (Magaki et al., 2019).

Les techniques de récupération des antigènes utilisant la chaleur sont les plus recommandées, mais celle que nous exploitons est la récupération enzymatique, car elle se limite à des antigènes spécifiques tels que les cytokératines et les immunoglobulines et utilise la trypsine ou la protéinase pour traiter les tissus (Kim et al., 2016). La protéinase mise en exergue dans mon travail est la chondroïtinase ABC, qui est une enzyme bactérienne de *Proteus Vulgaris*. C'est une lyase qui dégrade les chaînes sulfate de chondroïtine et dermatane sulfate des molécules de protéoglycane; elle possède également une activité hyaluronidase (Muir et al., 2019).

En fait, lorsque nous ramenons nos lames dans le laboratoire, nous les disposons dans un portoir ou plateau de coloration, puis à l'aide d'un marqueur hydrophobe, nous encerclons les sections où se trouvent nos tissus, ensuite nous faisons une suspension d'un aliquote de 50 µl de chondroïtinase

(5 µM de chondroïtinase avec 1 ml de BSA 0,01 %) dans 950 µl de PBS 1X, pH 8.0. Puis nous devons déposer de manière uniforme 50 µl de la suspension sur nos tissus avant de recouvrir le plateau d'incubation pour le porter à l'étuve à 37 °C pendant 1 h.

#### 2.8.4. Le blocage des sites non spécifiques

Immédiatement après la chondroïtinase, nous effectuons deux lavages au PBS 1X pour une min chaque, avant de faire passer nos tissus aux détergents à savoir d'abord le triton X-100 (TX100) et ensuite le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Le triton X-100 est l'un des agents tensioactifs non ioniques utilisés pour lyser les cellules afin d'en extraire les protéines et autres organites cellulaires ou pour perméabiliser la membrane des cellules vivantes en vue de la transfection (Koley & Bard, 2010), il est aussi utile pour minimiser la contamination des sections (Magaki et al., 2019). Tandis que le peroxyde d'hydrogène est utile pour empêcher l'oxydation endogène des tissus, en bloquant l'activité de la peroxydase qui se trouve dans les cellules (Bratthauer, 2010b).

Nous préparons d'abord une solution de 0,3% de Triton X-100 dans du PBS 1X, puis, nous déposons 50 µl de cette solution sur les tissus dont les lames ont été disposées sur le plateau de coloration et laissons agir pendant 20 à 30 min à température ambiante, ensuite nous effectuons trois lavages au PBS 1X pour une min chaque, puis nous faisons une dilution de 1/14 du peroxyde d'hydrogène dans du PBS 1X, et nous recouvrons nos tissus avec 50 µl de cette dilution et laissons en incubation pendant 15 min à température ambiante.

Une fois nos tissus ainsi apprêtés, nous passons au blocage des sites non spécifiques. Cette étape est précédée de deux lavages au PBS 1X pour une min chaque, puis nous allons préparer le sérum normal. En effet, le blocage des tissus se fait à l'aide du sérum normal, qui est une solution de couleur jaune contenue dans un flacon marqué en jaune retrouvé dans le kit de révélation d'anticorps ayant comme particularité que sa source (lapin ou souris ou chèvre) doit toujours être différente de celle de l'anticorps primaire. Pour réaliser notre blocage, nous faisons une dilution de 3 gouttes de sérum normal pur dans 10 ml de PBS 1X, puis nous mélangeons la solution obtenue avant de prélever et déposer 50 µl sur nos tissus et nous laissons incuber en température ambiante pendant 1 h.

### 2.8.5. L'ajout de l'anticorps primaire

Pendant le blocage au sérum normal, nous préparons l'anticorps primaire en faisant des dilutions, dans notre cas d'espèce, il s'agit de l'anticorps anti-GPR31. Généralement, nous nous servons de la fiche du fabricant pour déterminer les ratios de dilution qui sont généralement en-dessous de celui indiqué par le fabricant, ainsi nous préparons ainsi deux ou trois dilutions (si le fabricant indique 1/100, nous pouvons tester 1/75 et 1/50 et augmenter si possible si on n'arrive pas à voir le marquage). La détermination du facteur de dilution tient compte du nombre total de sections des tissus. Ainsi, la solution d'anticorps primaire s'obtient en faisant une dilution d'un volume de la solution stock dans un volume déterminé du sérum normal.

Une fois le blocage terminé, nous débarrassons l'excès de sérum sans rincer les lames et nous déposons 50 µl des gammes de dilution obtenue par les tissus suivant une répartition équivalente des sections et sans oublier de prévoir une section pour le contrôle constitué uniquement de sérum normal. Puis nous recouvrons le plateau de son couvercle, ensuite nous portons nos lames dans la chambre froide pour les laisser incuber le lendemain à 4 °C.

À noter, la solution d'anticorps primaire une fois préparée doit être déposée sur la glace avant son utilisation et le reste placé à -200C après utilisation. Elle peut être ainsi réutilisée après 6 à 7 jours de sa préparation.

### 2.8.6. L'ajout de l'anticorps secondaire

Le lendemain, nous ramenons nos lames de la chambre froide dans le laboratoire, puis nous débarrassons l'anticorps primaire sur les tissus en inclinant et tapotant deux fois la lame sur un papier absorbant ou en utilisant une pipette, ensuite nous faisons un lavage au PBS 1X (3x5 min). Nous préparons ensuite la solution d'anticorps secondaire en diluant une goutte de l'anticorps secondaire (provenant du lapin dans notre cas) stock dans le sérum normal préparé la veille. En effet l'anticorps secondaire stock tout comme le sérum normal proviennent d'un même kit et sont choisis en fonction de la source ou l'hôte de l'anticorps primaire. Il s'agit d'un réactif qui est dirigé contre l'hôte de l'anticorps primaire (anti-lapin IgG par exemple) contenu dans un flacon ayant une indication marquée en bleu. D'autre part, nous pouvons simplement préparer un nouveau sérum normal auquel on va ajouter une goutte d'anticorps secondaire.

Le lavage étant achevé et l'anticorps secondaire prêt, nous recouvrons nos tissus avec 50 µl de cette solution dans chaque section et nous laissons en incubation pendant 45 min à température ambiante.

La solution l'anticorps secondaire doit aussi être déposée sur de la glace avant son utilisation et peut être stockée à 40C après son utilisation.

#### 2.8.7. L'application du substrat ABC

Aussitôt après l'incubation de l'anticorps secondaire, nous préparons le substrat ABC en ajoutant dans un tube de 5 ml de PBS 1X, 2 gouttes du réactif A et 2 gouttes du réactif B, provenant du kit « VECTASTAIN Elite ABC system ». Nous mélangeons la solution et laissons incuber pendant au moins 30 min avant utilisation.

Le réactif A contient de l'avidine, une glycoprotéine basique présente dans le blanc d'œuf ainsi que dans les tissus d'oiseaux, de reptiles et d'amphibiens. Tandis que le réactif B contient la HRP biotinylée qui renferme la peroxydase de raifort et la biotine, un coenzyme connu aussi sous le nom de vitamine B8. La peroxydase de raifort ou HRP, une enzyme qui catalyse l'oxydation d'une grande variété de substrats en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme agent oxydant.

La méthode du complexe ABC qui signifie Avidin/Biotin Complex, repose sur l'affinité de l'avidine pour la biotine se liant de façon irréversible. L'enzyme peroxydase de raifort a la capacité d'incorporer de nombreuses molécules de biotine sans perte d'activité enzymatique. Le contact entre l'enzyme peroxydase de raifort et un réactif d'anticorps secondaire permet d'étendre la localisation enzymatique sur le site d'interaction de l'anticorps primaire avec l'échantillon, formant ainsi un complexe de réseau qui reste en solution (Bratthauer, 2010a).

Avant d'incuber les lames avec le substrat ABC, nous faisons un lavage de ceux-ci au PBS 1X (3x2 min), puis nous recouvrons chaque section avec 50 µl de substrat et nous laissons incuber pendant 45 min à température ambiante.

#### 2.8.8. L'application du chromogène

Le chromogène utilisé ici est le tétrahydrochlorhydrate de 3,3'-diaminobenzidine (DAB). La méthode liée au DAB repose sur la formation d'un précipité brun insoluble sur les sites d'activité de la peroxydase. En effet, dans la réaction de peroxydase, le DAB est oxydé par le peroxyde d'hydrogène dans une réaction généralement catalysée par la HRP. Le chromogène formé passe ainsi d'un état soluble incolore en un précipité brun très coloré qui est facilement visualisé par microscopie à fond clair (Gupta et al., 2023).

Au bout de 45 min d'incubation du substrat ABC, nous effectuons des lavages. D'abord un lavage au PBS 1X (2x1 min), puis un autre lavage à l'eau distillée (2x1 min). Ensuite nous devons laisser les lames dans l'eau et, tout comme précédemment, nous devons préparer notre chromogène à l'aide du kit « DAB Peroxidase Substrate », SK-4100, en ajoutant dans un tube de 15 ml, 5 ml d'eau distillée, 2 gouttes du réactif 1, 2 gouttes du réactif 3 et 4 gouttes du réactif 2. Puis nous recouvrons notre tube de papier aluminium pour empêcher la lumière d'entrer en contact avec notre solution de travail. En fait, le réactif 1 est constitué du peroxyde d'hydrogène, le réactif 3 est constitué d'une solution stock de tampon au pH 7.5 du fabricant et le réactif 2 du DAB.

Une fois le chromogène préparé, nous devons immédiatement le passer sur les lames, d'abord en déterminant le temps d'incubation maximale pour nos tissus. En fait, le DAB a la particularité d'avoir un signal assez prononcé lorsqu'il est au contact de la lumière et ce signal quelquefois peut rendre foncé ou noircir nos tissus, encombrant ainsi la visibilité du marquage des cellules. Nous testons d'abord sur une lame, en déposant 50 µl de DAB sur les sections de lame, puis nous lançons le chronomètre, et portons la lame au microscope pour observer l'apparition du marquage sur les tissus. Cette étape est critique, car nous devons veiller à ce que le DAB ne « brûle pas » les tissus. Dès qu'on observe l'apparition du marquage, nous stoppons immédiatement le chronomètre et la coloration en nous débarrassant de l'excès du colorant sur la lame dans un récipient contenant de la javel diluée au 10%, nous puis déposons celle-ci dans le portoir qui se trouve dans l'eau distillée. Le temps obtenu sera retenu pour toutes les autres lames et il varie souvent entre 5 à 7 min maximum.

En ce qui concerne le restant des lames si jamais nous en avons un grand nombre (10 à 20 lames par exemple), nous devons juste les étaler sur le plateau d'incubation et déposer 50 µl du DAB, puis lancer le chronomètre au temps obtenu sur la lame test, puis laisser incuber. Pendant ce temps on peut au besoin observer les lames au microscope pour noter la qualité du marquage qui apparaît. Lorsque le temps d'incubation écoulé, nous nous débarrassons de l'excès de colorant comme décrit précédemment.

Nous utilisons comme contrôle qualité un contrôle négatif parmi nos lames sur une section. Il s'agit d'une section qui a subi la même préparation que l'ensemble de nos lames, excepté l'ajout de l'anticorps primaire. On est sensé obtenir aucun marquage indiquant que les réactifs et la technique employés sont conformes.

### 2.8.9. La contre coloration

Une contre coloration est effectuée pour différencier une ou plusieurs phases dans un tissu. Dans notre cas, nous utilisons l'éosine comme contre colorant du DAB, car il a la particularité de colorer le cytoplasme des cellules en rose ou en rouge, tandis le DAB, lui va marquer les noyaux des cellules en brun foncé.

Les lames dans l'eau distillée, vont être transportées sous la hotte pour la coloration. Cette étape se déroule à peu près en contre sens de celle du déparaffinage et se passe comme suit. Nous remplissons premièrement les bacs de coloration avec environ 250 ml de chaque solution à utiliser dans un ordre précis à savoir une solution d'alcool 80%, une solution de travail d'éosine 1%, trois solutions d'alcools 100% et une solution de xylène. Puis, nous réglons le chronomètre à 13 min. Par la suite, nous plongeons tour à tour les lames dans chaque bac en débutant par l'alcool 80% (30 secondes), éosine (2 secondes); puis nous introduisons dans le bac de l'alcool I 100% (5 min) et immédiatement déclenchons la minuterie. Ensuite, nous continuons alcool II 100% (3 min), alcool III 100% (3 min) et nous achevons avec le xylène (2 min). Au bout de ce temps, les lames peuvent rester dans le xylène pendant que nous apposons les lamelles pour couvrir nos tissus.

Pour apposer les lamelles, nous utilisons de la colle en liquide de montage rapide pour la microscopie (Entellan®, Sigma Aldrich). À l'aide d'une pipette à poire, nous aspirons le liquide collant dans son flacon de stockage, ensuite nous faisons une ligne légèrement épaisse sur une des extrémités de la longueur de la lamelle, ensuite nous disposons la lame sur un papier absorbant puis nous déposons délicatement la lamelle sur celle-ci à partir du côté qui porte la colle. Nous procédons ainsi pour chaque la lame avant de les ranger dans un classeur approprié à l'abri de la lumière.

## 2.9. L'extraction de l'ARN et la PCR en temps réel

### 2.9.1. Extraction de l'ARN

Les ARNs ont été extraits des chondrocytes et des synoviocytes avec le réactif TRIzol (Invitrogen/life technologies) et purifiés par le kit RNeasy mini kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. L'ajout de Trizol, puis de chloroforme et de l'isopropanol a permis la séparation des ARNs totaux des autres constituants cellulaires. Ensuite la phase aqueuse contenant les ARN a été récupérée. L'éthanol a été ajouté afin de créer un environnement optimal pour la liaison des ARNs sur la couche de silice après transfert sur la colonne d'extraction du kit RNeasy mini (Qiagen). Les ARNs ont été lavés avec l'éthanol à 75% et purifiés par plusieurs centrifugations successives puis dissous dans 30 µl d'eau ultra pure RNase-Free (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Les ARNs ont été dosés au Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). À une DO de 260 nm, les concentrations variaient entre 25 et 40 ng/µl. Le rapport absorbance 260/280 était compris entre 1,8 et 2,1 pour chaque échantillon. Les conditions de l'extraction de l'ARN ont été mises en place en utilisant des cartilages arthrosiques initialement. Les ARN extraits ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### 2.9.2. La reverse transcriptase PCR

La reverse transcription des ARNs totaux (RT-PCR) permet de synthétiser les ADNc monocaténaire correspondants. Elle a été réalisée en utilisant la reverse transcriptase, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ou M-MLV RT (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Elle a nécessité une solution de 50 µl contenant, entre autres, des amorces hexanucléotidiques aléatoires, l'ADN polymérase, la reverse transcriptase, des inhibiteurs des RNases, des nucléotides (dNTPs) et l'ARN. Chaque réaction de transcription inverse a été réalisée en trois exemplaires. Ensuite, la reverse transcription se fait dans un thermocycleur à 42°C pendant 15 min et la dénaturation de la polymérase se fait à 99°C pendant 5 min. L'expression relative de l'ARNm dans les chondrocytes et des synoviocytes a été quantifiée selon la méthode Ct, comme décrit par les instructions du fabricant. Chaque échantillon a été dupliqué pour chaque expérience indépendante. Les cDNA formés ont immédiatement été conservés à -20 °C.

### 2.9.3. La PCR en temps réel

La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) est une méthode de quantification précise et sensible des séquences d'ADN, à partir de l'ADN génomique ou l'ADNc obtenu par transcription inverse à partir d'ARN. Elle permet d'observer en temps réel l'amplification de la matrice d'intérêt. La réaction de PCR s'effectue en utilisant des amorces nucléotidiques spécifiques de la région à quantifier et des composés fluorescents se liant à l'ADN ou liés à des sondes et donnant un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN formée à chacun des cycles de PCR.

Pour ce faire, le produit de la réaction de transcription inverse a été soumis à une analyse PCR en utilisant « Rotor gene Q' (Qiagen) et le kit « QuantiTect SYBRGreen PCR » (Qiagen), conformément aux instructions du fabricant. Le SYBRGreen est l'agent fluorescent qui en se fixant sur les brins d'ADN néoformés permet de les visualiser sur l'écran et quantifier l'expression des gènes d'intérêts. Nous avons déterminé initialement les amorces à l'aide du programme « Primer Blast » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). La qPCR a été réalisée en utilisant le mélange Fast SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les réactions ont été réalisées en triplet. Pour chaque réaction, nous avons utilisé 12,5 µl d'une solution contenant chacune 5 µl d'ADNc, 7,5 µl de mélange composé de mix SYBR green, des amorces et de la Taq polymérase. Les amorces suivantes ont été utilisées: GRP31 humain: sens 5'-

AGGTCAACCTGCTGTCTCCTCA-3' et antisens 5'-CCTGGAGTAGAACTGTGGCAC-3';

GAPDH : sens 5'-CAGAACATCATCCGCCT-3' et antisens 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG-3'.

Les conditions du thermocycleur ci-après (Tableau 5) ont été respectées pour l'amplification:

**Tableau 5***Conditions d'amplification*

Étapes	Condition	Température	Durée	Nombre de cycle
<b>1</b>	Activation de la polymérase	95 °C	10 min	1
<b>2</b>	Dénaturation de l'ADN	95 °C	10 secs	40
<b>3</b>	Hybridation avec les amorces	60 °C	20 secs	
<b>4</b>	Élongation	72 °C	20 secs	
<b>5</b>	Courbe de fusion	60-95 °C avec une augmentation de 0,5 °C	Après 2 à 5 secs	1

Nous avons utilisé le gène de contrôle GAPDH qui est le plus utilisé et un contrôle ne contenant pas d'enzyme. L'importance et la spécificité des amplifications ont été vérifiées par migration électrophorétique sur un gel d'agarose de 1 %.

## **2.10. Analyses des données**

Le logiciel Excel de Microsoft Office nous a servi de feuille de calculs et d'analyses des données pour la production de tests statistiques comme le test de Student et le test d'ANOVA. Les différences étaient significatives lorsque la valeur de  $p$  était inférieure à 0,05 et les marges d'erreurs ont été obtenus directement à partir du logiciel Excel.

Le logiciel Imagelab de Bio-rad® nous a permis d'obtenir des données à partir des captures d'images des Western-blot. En effet, les bandes protéiques d'intérêts sont quantifiées grâce à la mesure du signal qu'elles émettent, ce qui permet ainsi de montrer l'expression relative de la protéine. De plus, une bande protéique est une caractéristique identifiable dans une image de western blot composée de pixels contenant des informations sur la quantité de signal recueillie à chaque coin de l'image. Ainsi, l'image numérique obtenue, est une composante de données en trois dimensions car chaque pixel d'une image de tache possède une coordonnée  $x$  et  $y$ , et une valeur d'intensité, qui occupe la troisième dimension. De fait, la quantité d'une bande peut être considérée comme un volume, qui correspond à la quantité totale de signal pour tous les pixels de cette bande.

## **Chapitre 3 – Résultats**

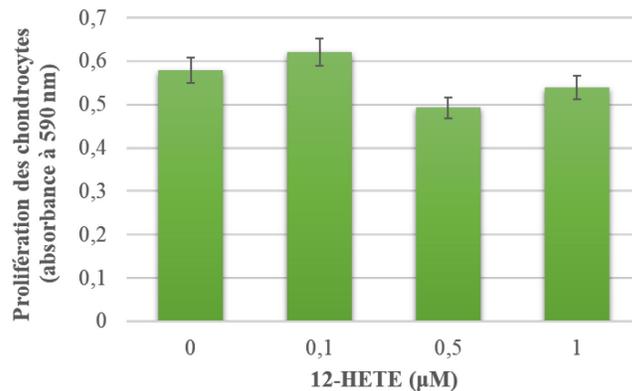
# 1. Évaluation de l'effet du 12-HETE sur la viabilité cellulaire dans l'OA

## 1.1. Effet du 12-HETE et du contrôle sur la prolifération des chondrocytes

Le test de prolifération cellulaire a été réalisé pour évaluer le taux de croissance des chondrocytes arthrosiques en présence et en absence du 12-HETE. Des doses graduelles du 12-HETE (0-1  $\mu\text{M}$ ) ont été apportées aux chondrocytes en culture et le bromure de 3-(4,5-diméthyl-thiazol) -2,5-diphényl-SH- tétrazolium (MTT) a été ajouté dans le milieu. La réaction des chondrocytes avec le MTT a été révélée par le DMSO, dont l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 590 nm. Les niveaux de prolifération des chondrocytes ont été évalués par rapport à la normale (0  $\mu\text{M}$ ). Les résultats montrent que la 12-HETE n'a pas d'effet sur la prolifération des chondrocytes (Figure 10).

**Figure 10**

*La 12-HETE n'affecte pas la prolifération des chondrocytes.*



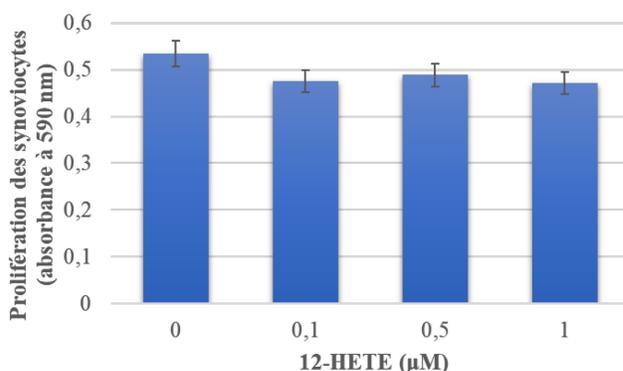
Les chondrocytes arthrosiques humains (N=3) ont été incubées avec différentes concentrations du 12-HETE (0-1  $\mu\text{M}$ ) pendant 72 h. Les niveaux de prolifération cellulaire ont été obtenus par le test au MTT avec une absorbance mesurée par spectrophotométrie à 590 nm. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs de p sont supérieures à 0,05 ( $p=0,36$ )

## 1.2. Effet du 12-HETE et du contrôle sur la prolifération des synoviocytes

Le test de prolifération cellulaire a été réalisé pour évaluer le taux de croissance des synoviocytes arthrosiques en présence et en absence du 12-HETE. Des doses graduelles du 12-HETE ont été ajoutées aux synoviocytes en culture et le MTT dans le milieu. La réaction entre les synoviocytes et le MTT a été révélée par le DMSO dont l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 590 nm. Les niveaux de prolifération des synoviocytes ont été évalués par rapport à la normale (0  $\mu$ M). Les résultats (Figure 11) montrent que la 12-HETE n'a pas d'effet sur la prolifération des synoviocytes.

**Figure 11**

*La 12-HETE n'affecte pas la prolifération des synoviocytes.*



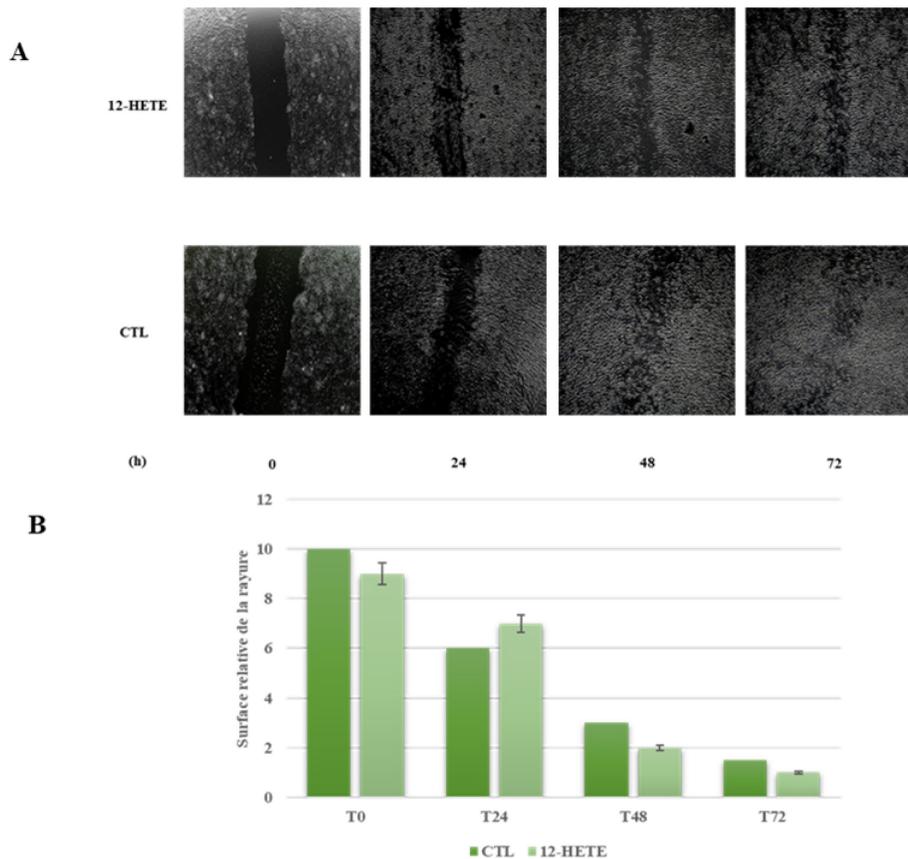
Les synoviocytes arthrosiques (N=3) ont été incubées avec différentes concentrations du 12-HETE (0-1  $\mu$ M) pendant 72 h. Les niveaux de prolifération cellulaire ont été obtenus par le test au MTT avec une absorbance mesurée par spectrophotométrie à 590 nm. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs de  $p$  sont inférieures à 0,05 ( $p=1,68E-5$ )

### 1.3. Effet du 12-HETE et du contrôle sur la migration des chondrocytes

Le test de rayure a été réalisé pour évaluer la capacité des chondrocytes articulaires à migrer en présence et en absence du 12-HETE. Les chondrocytes ont été cultivés avec le milieu de privation pendant 48 h. Une rayure en forme de croix a été effectuée dans chaque puits. Des doses graduelles du 12-HETE comprises entre 0 et 1  $\mu$ M ont été distribuées dans différents puits contenant les chondrocytes. Des captures d'images ont été prises par microscopie électronique à la même période pendant trois jours. Les niveaux de migration des chondrocytes ont été évalués par rapport au contrôle (CTL) (Figure 12). Les résultats ont montré que la 12-HETE n'a pas d'effet sur la migration des chondrocytes.

**Figure 12**

*La 12-HETE n'a pas d'effet sur la migration des chondrocytes.*



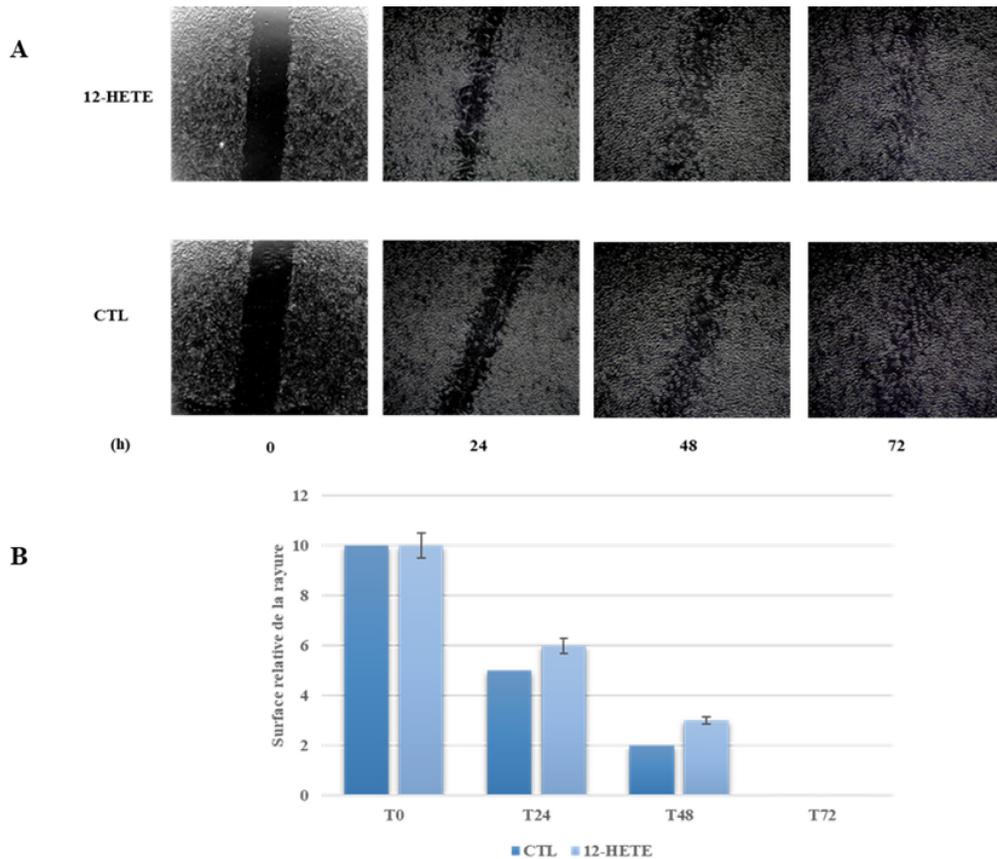
Une rayure a été effectuée dans chaque puit et les chondrocytes ont ensuite été traitées avec 1  $\mu$ M du 12-HETE. Des captures d'images de t(0) à t(72) h ont été faites par microscopie électronique (A). Les images ci-dessus sont représentatives de résultats obtenus à partir d'une série de trois tests effectués sur trois donneurs distincts (N=3). La surface relative de la rayure (B) a été obtenue à partir de la moyenne des distances mesurées des trois sections opérées sur la rayure. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs de  $p$  sont supérieures à 0,05 ( $p=0,89$ )

## 1.4. Effet du 12-HETE et du contrôle sur la migration des synoviocytes

Le test de rayure a été réalisé pour évaluer la capacité des synoviocytes articulaires à migrer en présence et en absence du 12-HETE. Les synoviocytes ont été cultivés avec le milieu de privation pendant 48 h. Une rayure en forme de croix a été effectuée dans chaque puits. Des doses graduelles du 12-HETE comprises entre 0 et 1  $\mu$ M ont été distribuées dans différents puits contenant les synoviocytes. Des captures d'images ont été prises par microscopie électronique à la même période pendant trois jours (Figure 13). Les niveaux de migration des chondrocytes ont été évalués par rapport au CTL. Les résultats ont montré que la 12-HETE n'a pas d'effet sur la migration des synoviocytes.

**Figure 13**

*La 12-HETE n'a pas d'effet sur la migration des synoviocytes.*



Une rayure a été effectuée dans chaque puit et les synoviocytes ont ensuite été traitées avec 1  $\mu$ M du 12-HETE. Des captures d'images de t(0) à t(72) h ont été faites par microscopie électronique (A). Les images ci-dessus sont représentatives de résultats obtenus à partir d'une série de trois tests effectués sur trois donneurs distincts (N=3). La surface relative de la rayure (B) a été obtenue à partir de la moyenne des distances mesurées des trois sections opérées sur la rayure. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs de  $p$  sont supérieures à 0,05 ( $p=0,8$ )

## **2. Effet du 12-HETE sur les réponses inflammatoires et cataboliques**

Pour étudier l'effet anti-inflammatoire et anti-catabolique du 12-HETE sur les chondrocytes et les synoviocytes arthrosiques, nous avons évalué son impact sur les médiateurs clés de l'OA, à savoir COX-2, MMP-1 et MMP-13. Étant donné qu'il est rapporté dans certaines études récentes que la MMP-13 est rarement détectée dans les synoviocytes humaines arthrosiques après une stimulation par l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , nous nous sommes uniquement attardés sur l'expression de MMP-1 dans ce type cellulaire (Schneider et al., 2007). Pour ce faire, les cellules OA ont été traitées avec des concentrations croissantes du 12-HETE (1, 2.5, 5 et 10  $\mu$ M) pendant 1 h puis stimulées avec 100 pg/ml d'IL-1 $\beta$  pendant 24 h. Notons que dans toutes les expériences, le contrôle équivaut aux différentes cellules OA non prétraitées à la 12(S)-HETE et non stimulés avec IL-1 $\beta$ . Les protéines des lysats cellulaires et les surnageants de milieu de culture ont été analysés par Western blot pour déterminer l'expression de ces protéines.

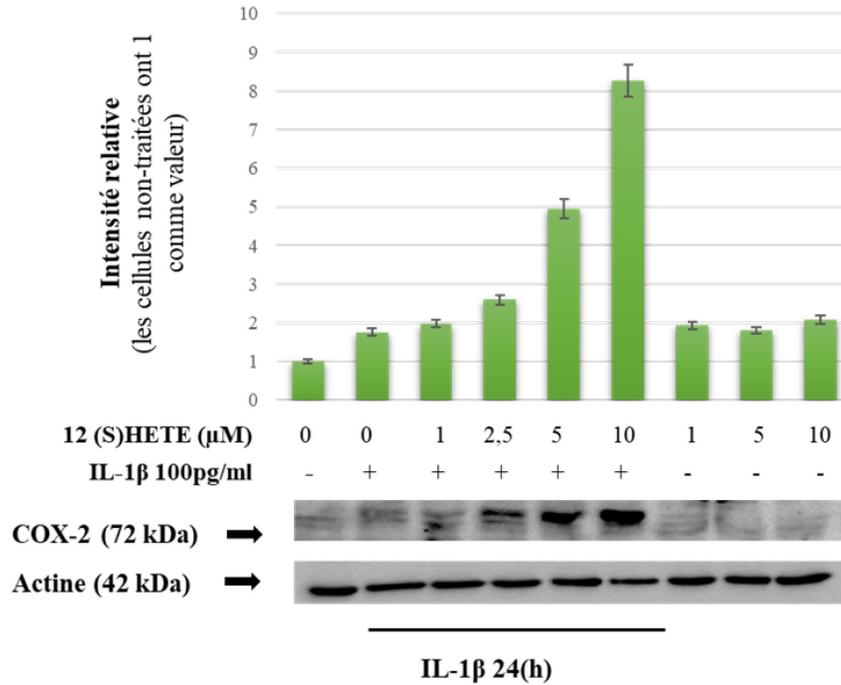
### **2.1. Dans les chondrocytes**

#### 2.1.1. Expression de la protéine COX-2

Tel que représenté dans la figure 14, le niveau d'expression de COX-2 est presque indétectable dans les conditions normales. Cependant, concernant les chondrocytes (N=3) stimulés uniquement avec IL-1 $\beta$ , nous observons une augmentation de l'expression de COX-2 à 1,76 unité par rapport au contrôle. La 12- HETE augmente le niveau d'expression de COX-2 par rapport à celui obtenu avec la stimulation à IL-1 $\beta$  seule, et cela, dès 1  $\mu$ M. Nos résultats démontrent clairement que la 12-HETE active l'expression de COX-2 dans les chondrocytes en présence de l'IL-1 $\beta$  dépendamment de la dose, car cette augmentation est statistiquement significative ( $p=0,047$ ). Mais, elle n'affecte pas l'expression de COX-2 en absence de l'IL-1 $\beta$  ( $p=0,169$ ). Le fait qu'on observe des bandes doubles sur les panneaux du blot est mis à la contribution du lot d'anticorps COX-2, que nous avons utilisé, car avec d'autres lots d'anticorps nous avons juste qu'une seule bande.

**Figure 14**

*Effet du 12-HETE sur l'expression de la protéine COX2 dans les chondrocytes arthrosiques.*



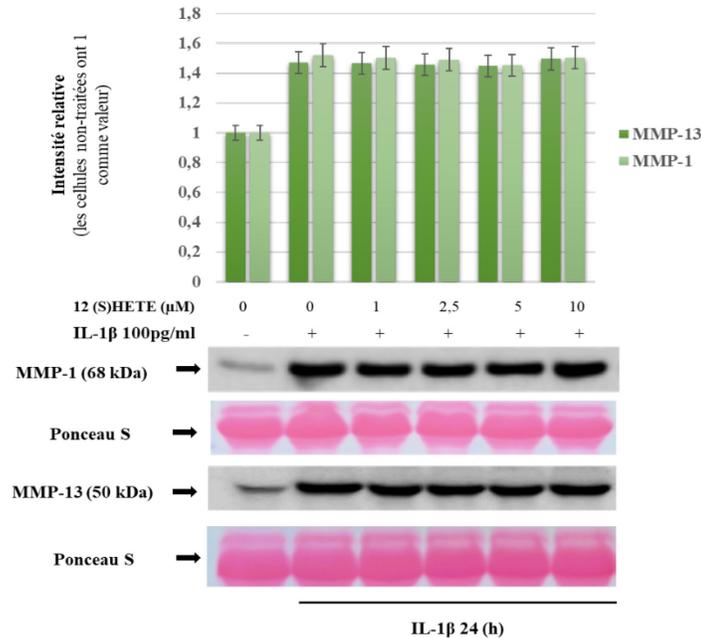
Les chondrocytes arthrosiques (N=3) ont été prétraités avec la 12-HETE (1-10 μM) pendant 1 h, puis stimulés avec IL-1β (100 pg/ml) pendant 24 h. Des lysats cellulaires ont été préparés et analysés pour l'expression de la protéine COX-2 (panneau supérieur) et β-actine (panneau inférieur) par Western blotting. Les contrôles ont été normalisées à 1 et les autres valeurs ont été comparées au contrôle. Les résultats représentent la moyenne ± SEM. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs de *p* significatives sont inférieures à 0,05. Les bandes sont représentatives de résultats similaires obtenus à partir de trois expériences différentes

### 2.1.2. Expression des protéines MMP-1 et MMP-13

MMP-1 et MMP-13 sont contenus dans le milieu de culture (surnageant). Nous avons récolté les surnageants de trois cellules chondrocytaires arthrosiques (N=3) distincts pour effectuer des western blots en triplicata. Nos tests ont révélé que les niveaux d'expression de MMP-1 et MMP-13 sont faibles dans le contrôle (0  $\mu\text{M}$ ); l'IL-1 $\beta$  seul augmente l'expression des protéines MMP-1 et MMP-13 comparé au contrôle et, aux concentrations 1, 2,5, 5 et 10  $\mu\text{M}$ , il n'y a pas de variation de l'effet de la 12 (S)-HETE sur les niveaux d'expression protéiques de MMP-1 et MMP-13 (Figure 15). Nos résultats démontrent clairement que la 12-HETE n'affecte pas l'expression de MMP-1 et MMP-13 dans les chondrocytes en présence de l'IL-1 $\beta$  dépendamment de la dose. De plus, il n'y a pas de différence significative ( $p=0,35$ ) entre les niveaux expressions de MMP-1 et MMP-13.

#### Figure 15

*Effet du 12-HETE sur l'expression des protéines MMP-1 et MMP-13 dans les chondrocytes arthrosiques.*



Les surnageants ont été prétraités avec des concentrations croissantes du 12-HETE pendant 1 h, puis stimulés avec IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) durant 24 h. L'expression des protéines MMP-1 et MMP-13 a été évaluée dans les surnageants par Western blotting. Les contrôles ont été normalisés à 1 et les autres valeurs ont été comparées au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM.

Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs significatives de p sont inférieures à 0,05. Les bandes sont représentatives de résultats similaires obtenus à partir de trois expériences différentes. Ces résultats sont représentatifs de résultats obtenus à partir de trois expériences différentes utilisant des surnageants obtenus de donneurs distincts

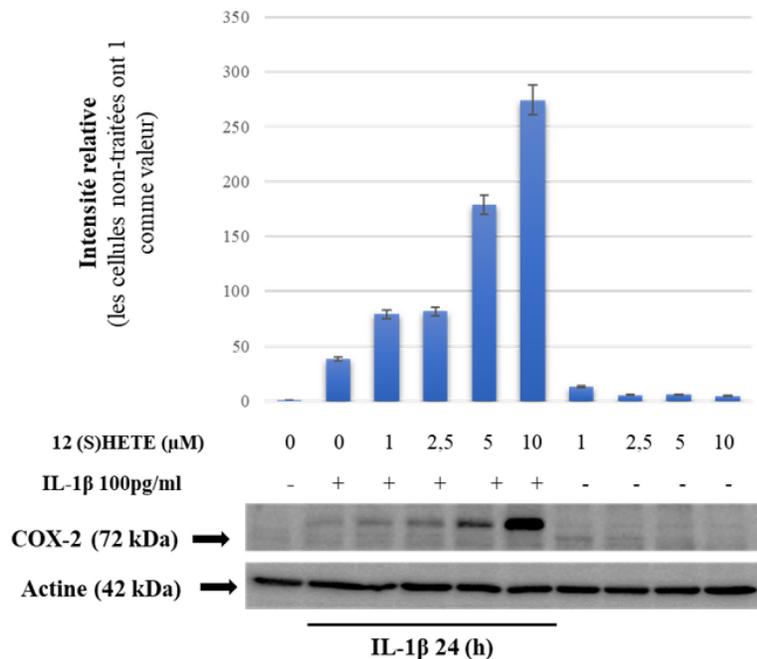
## 2.2. Dans les synoviocytes

### 2.2.1. Expression de la protéine COX-2

Dans la figure 16, le niveau d'expression de COX-2 est presque indétectable dans les conditions normales ou contrôle (0  $\mu\text{M}$ ). Cependant, au niveau des synoviocytes (N=3) stimulés uniquement avec IL-1 $\beta$ , nous notons une augmentation de l'expression de COX-2 de 1 à 38 unités par rapport au contrôle. La 12- HETE augmente le niveau d'expression de COX-2 par rapport à celui obtenu avec la stimulation à IL-1 $\beta$  seule, et cela, dès 1  $\mu\text{M}$ . Nos résultats démontrent que la 12-HETE active l'expression de COX-2 dans les chondrocytes en présence de l'IL-1 $\beta$  dépendamment de la dose, car cette augmentation est statistiquement significative ( $p=0,009$ ). Mais, elle diminue l'expression de COX-2 en absence de l'IL-1 $\beta$  bien cette diminution ne soit pas statistiquement significative ( $p=0.099$ ).

#### Figure 16

*Effet du 12-HETE sur l'expression de la COX-2 dans les synoviocytes arthrosiques.*



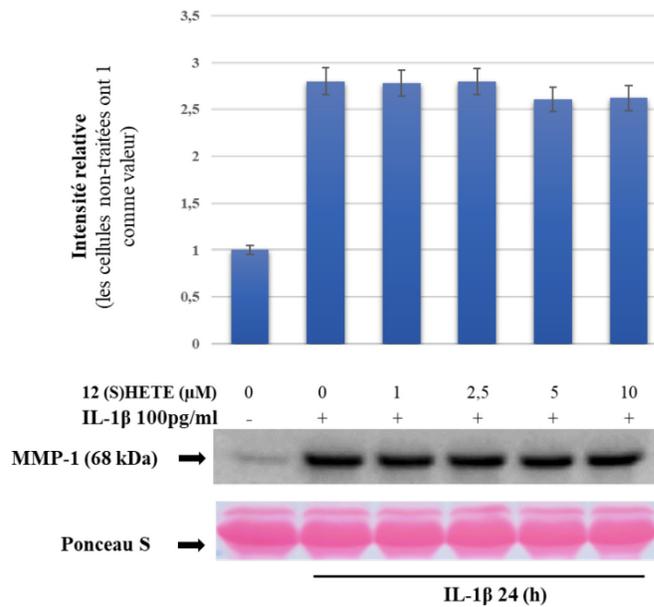
Les synoviocytes arthrosiques (N=3) ont été prétraités avec la 12-HETE (1-10  $\mu$ M) pendant 1 h, puis stimulés avec IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) pendant 24 h. Des lysats cellulaires ont été préparés et analysés pour l'expression de la protéine COX-2 (panneau supérieur) et  $\beta$ -actine (panneau inférieur) par Western blotting. Les contrôles ont été normalisés à 1 et les autres valeurs ont été comparés au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs significatives de p sont inférieures à 0,05. Les bandes sont représentatives de résultats similaires obtenus à partir de trois expériences différentes

### 2.2.2. Expression des protéines MMP-1

Nous avons récolté les surnageants des synoviocytes arthrosiques (N=3) distincts pour effectuer trois séries de western blots. Nos tests ont révélé que le niveau d'expression de MMP-1 est faible dans le contrôle (0  $\mu$ M); l'IL-1 $\beta$  seul augmente l'expression de MMP-1 comparé au contrôle et, aux concentrations 1, 2,5, 5 et 10  $\mu$ M, il n'y a aucune variation de l'effet de la 12-HETE sur le niveau d'expression protéique de MMP-1 (Figure 17). Les résultats obtenus révèlent que la 12-HETE n'affecte l'expression de la protéine MMP-1 induite par IL-1 $\beta$  indépendamment de la dose. De plus, la valeur de  $p$  sur l'expression de MMP-1 n'est pas significative ( $p=0,694$ ).

**Figure 17**

*Effet du 12-HETE sur l'expression des protéines MMP-1 dans les synoviocytes arthrosiques.*



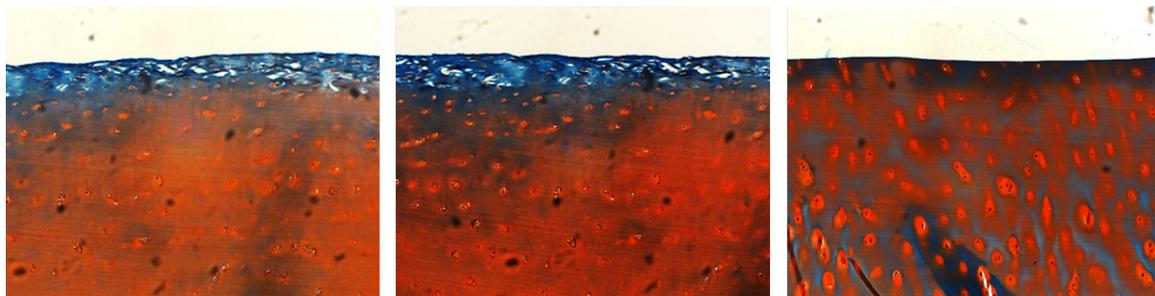
Les surnageants (N=3) ont été prétraités avec des concentrations croissantes du 12-HETE pendant 1 h, puis stimulées avec IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) durant 24 h. L'expression des protéines MMP-1 a été évaluée dans les surnageants par Western blotting. Les contrôles ont été normalisées à 1 et les autres valeurs ont été comparées au contrôle. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs significatives de  $p$  sont inférieures à 0,05. Ces résultats sont représentatifs de résultats obtenus à partir de trois expériences différentes utilisant des surnageants obtenus de donneurs distincts

### 3. Représentation histologique de l'OA

Des coupes représentatives colorées à la safranine-O des cartilages articulaires humains normaux (N=3) et OA (N=3) sont présentées dans les figures 18 et 19. Le cartilage articulaire morphologiquement normal est caractérisé par une surface lisse, une présence cellulaire abondante et une coloration prononcée de la safranine-O (Figure 18). Tandis que le développement de l'OA se caractérise par des lésions arthrosiques, matérialisées par un cartilage qui présente des irrégularités de surface, et une diminution de la coloration à la safranine-O (Figure 19). Sur certaines coupes on a remarqué une diminution des chondrocytes facilement détectable au microscope et chez d'autres, on pouvait apprécier les traits caractéristiques de la pathogenèse de l'OA avec une érosion superficielle accentuée, accompagnée d'une augmentation de la perte de protéoglycanes, de la formation d'ostéophytes et de la sclérose de l'os sous-chondral (résultats non montrés).

**Figure 18**

*Cartilage humain normal.*



La safranine-O a été utilisée pour colorer les protéoglycanes du cartilage afin de pouvoir visualiser le cartilage articulaire non dégradé par rapport aux tissus environnants qui ont été colorés en vert par la " fast green stain " (coloration verte rapide). La coloration rouge indique la présence de protéoglycanes dans le cartilage

## Figure 19

*Cartilage humain OA.*



La safranine-*O* a été utilisée pour colorer les protéoglycanes du cartilage afin de pouvoir visualiser le cartilage articulaire dégradé par rapport aux tissus environnants qui ont été colorés en vert par la " fast green stain " (coloration verte rapide). La coloration rouge indique la présence de protéoglycanes dans le cartilage

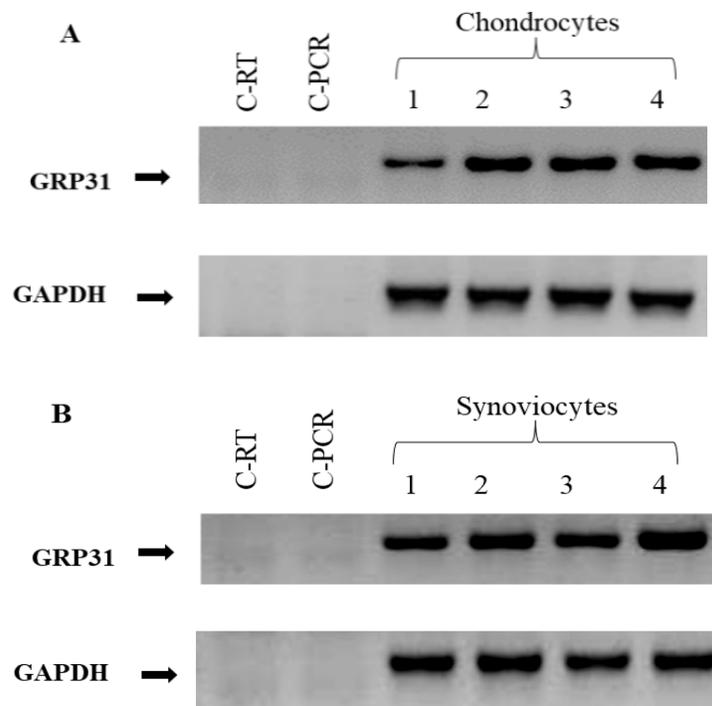
## 4. Expression de la GRP 31 dans les tissus articulaires

### 4.1. Expression de GRP 31 dans les chondrocytes et les synoviocytes articulaires arthrosiques humaines.

Afin de susciter des effets dans les cellules articulaires, la 12-HETE se lie au préalable à des récepteurs, en occurrence GRP31, dont l'impact dans la pathogenèse de l'OA n'a pas encore été étudié. Nous avons vérifié la présence de ce récepteur dans les chondrocytes et les synoviocytes OA. La figure 20 présente les niveaux d'ARN du gène *GRP31* dans ces cellules chez différents patients atteints d'OA. Ces résultats démontrent que les chondrocytes et les synoviocytes OA expriment bel et bien le récepteur GRP31. Cependant, nous n'avons pas pu vérifier l'expression de ce récepteur dans les cellules normales parce que nous n'en disposions pas.

**Figure 20**

*Les chondrocytes et les synoviocytes du cartilage humain expriment le GRP31.*



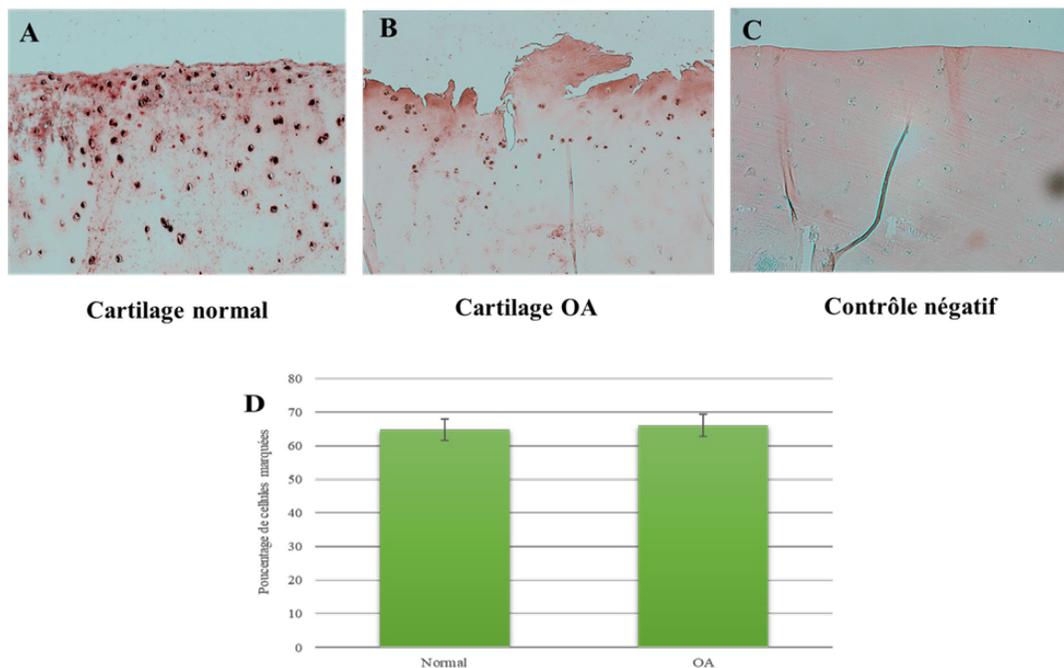
Les chondrocytes (**A**) et les synoviocytes (**B**) ont été isolés à partir de cartilage de genou OA et maintenus en culture monocouche pendant 7 à 10 jours. L'ARN total a été préparé, transcrit en ADNc et traité pour la PCR en utilisant des amorces spécifiques pour le *GRP31* et la GAPDH. Les produits PCR ont été résolus sur un gel d'agarose à 1 % et colorés au bromure d'éthidium. C-RT et C-PCR sont des contrôles négatifs pour la transcription inverse et la réaction PCR respectivement

## 4.2. Expression de la GRP 31 sur les tissus humains dégradés et non dégradés

Nous avons examiné par la technique d'immunohistochimie, la présence de GRP31 dans les cartilages normaux (n=3) et OA de l'humain (n=3) (Figure 21). Les points noirs sur les coupes histologiques représentent le marquage avec l'anticorps spécifique pour chaque récepteur. Le marquage en rose correspond à l'éosine. La spécificité du marquage est confirmée par la coloration à l'IgG de lapin non immun (contrôle). L'évaluation statistique du score cellulaire pour GRP31 n'a pas révélé de différence significative entre le normal et l'OA ( $p= 0.92$ ). Les images ci-dessous ne sont pas représentatif de ce résultat, il s'agit d'une illustration de la qualité des tests qui ont été réalisés sur les coupes. Ces résultats montrent que l'expression de GRP31 est identique dans les deux cartilages. Nous tenons à souligner que c'est la première fois que la présence de GRP31 est montrée dans les chondrocytes normaux et OA au niveau tissulaire. Ces résultats permettent ainsi de révéler la présence du récepteur couplé à la protéine G (RCPG) du 12-HETE dans le cartilage humain.

**Figure 21**

*Expression de la protéine qui code pour le gène GRP31 dans le cartilage normal et arthrosique.*



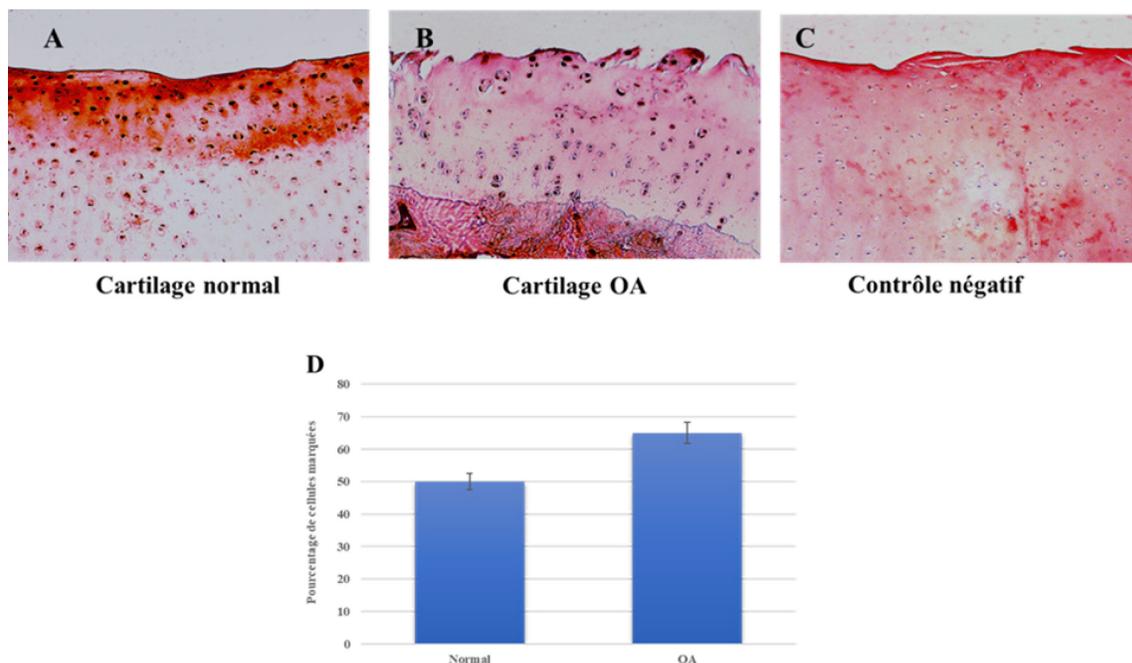
Immunomarquage représentatif du cartilage humain normal ou non dégradé (A) et du cartilage arthrosique ou dégradé (B) pour le GRP31, également connu sous le nom de récepteur 12-HETE. L'image (C) est le contrôle négatif. (D) le pourcentage de chondrocytes exprimant GRP31 dans le cartilage normal et le cartilage arthrosique ou OA. Un test ANOVA a été réalisé pour comparer les résultats. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  SEM pour 3 spécimens normaux et 3 spécimens arthrosiques.  $p > 0,05$  par rapport au cartilage normal

### 4.3. Expression de la GRP 31 sur les tissus dégradés et non dégradés du chien

Nous avons également recherché l'expression de GRP31 dans les cartilages normaux (n=3) et OA (n=3) du chien par une analyse immunohistochimique. En effet, le chien est modèle animal que nous avons choisi pour faire l'investigation de GRP31, nous aurions pu le faire chez la souris mais, la structure morphologique du genou du chien se rapproche un peu plus de ce qu'on observe l'humain comparé à la souris. Le comptage s'est fait comme décrit précédemment. Dans le cartilage normal, l'immunomarquage positif pour GRP31 était plus visible au niveau des chondrocytes de la couche superficielle. Cependant, le score cellulaire était plus élevé dans le cartilage OA que dans le cartilage normal (Figure 22). L'évaluation statistique du score cellulaire pour GRP31 n'a pas révélé des différences significatives entre le cartilage normal et le cartilage OA ( $p= 0,48$ ). La spécificité de la coloration a été confirmée comme décrit ci-dessus. Les images ci-dessous ne sont pas représentatif du résultat évoqué, il s'agit d'une illustration de la qualité des tests qui ont été réalisés sur les coupes histologiques.

**Figure 22**

*Expression de la protéine qui code pour le gène GRP31 dans le cartilage normal et OA.*



Immunomarquage représentatif du cartilage du chien normal ou non dégradé **(A)** et du cartilage arthrosique ou dégradé **(B)** pour le GRP31, également connu sous le nom de récepteur 12-HETE. L'image **(C)** est le contrôle négatif. **(D)** Pourcentage de chondrocytes exprimant GRP31 dans le cartilage normal et le cartilage arthrosique. Un test ANOVA a été réalisé pour comparer les résultats. Les résultats sont des moyennes  $\pm$  SEM pour 3 spécimens normaux et 3 spécimens arthrosiques.  $p > 0,05$  par rapport au cartilage normal

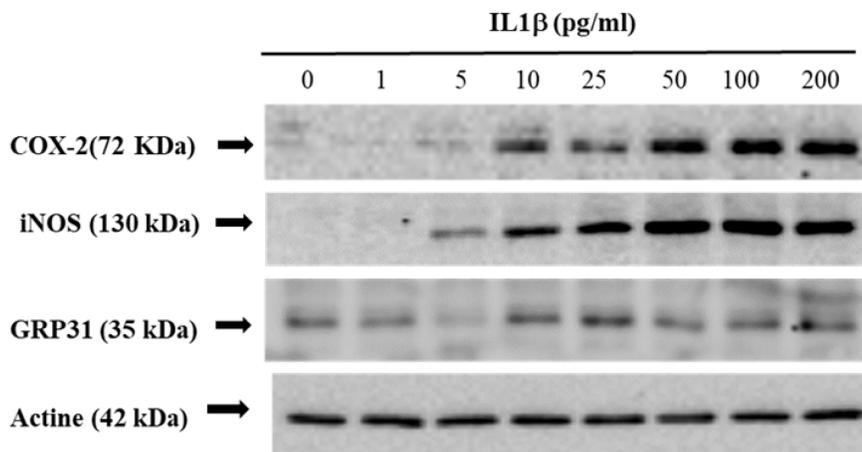
## 5. Effet l'IL-1 $\beta$ sur COX-2, iNOS et GRP 31.

### 5.1. Au niveau des chondrocytes

Pour explorer les mécanismes de régulation de COX-2, iNOS et GPR31 dans le cartilage, nous avons évalué l'effet dose dépendant de l'IL-1 $\beta$ , un médiateur clé dans la pathogenèse de l'OA, à la fois sur l'expression de ces trois protéines et sur la production de la  $\beta$ -actine par les chondrocytes arthrosiques. L'expression de ces protéines a été recherché auprès des chondrocytes OA provenant de trois (N=3) donneurs distincts. Dans des conditions optimales de culture, les chondrocytes OA ont de faibles niveaux d'expression des protéines COX-2 et iNOS, mais, avec un niveau d'expression de GRP31 élevé. Le traitement à l'IL-1 $\beta$  augmente l'expression des protéines COX-2 à 1 pg/ml et iNOS à 5 pg/ml. Cependant, l'expression de la GRP31 a diminué jusqu'à 5 pg/ml, pour ensuite augmenter à 10 et 25 pg/ml, et enfin diminué à partir de 50 pg/ml. (Figure 23). L'IL-1 $\beta$  induit une augmentation de l'expression de COX-2 ( $p=0,050$ ) et iNOS ( $p=0,280$ ) tandis qu'il semble optimiser l'expression de GRP31 à 25 pg/ml ( $p=0,452$ ). En outre, le niveau de la  $\beta$ -actine n'a pas été modifié par le traitement à l'IL-1 $\beta$ .

#### Figure 23

*Effet de l'IL-1 $\beta$  sur l'expression des protéines COX-2, iNOS et GPR31 dans les chondrocytes OA.*



Les chondrocytes ont été stimulés avec des doses croissantes d'IL-1 $\beta$  (pg/ml) pendant 24h. Des lysats cellulaires ont été préparés et analysés pour les protéines COX-2, iNOS et GRP31 par Western blotting. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à

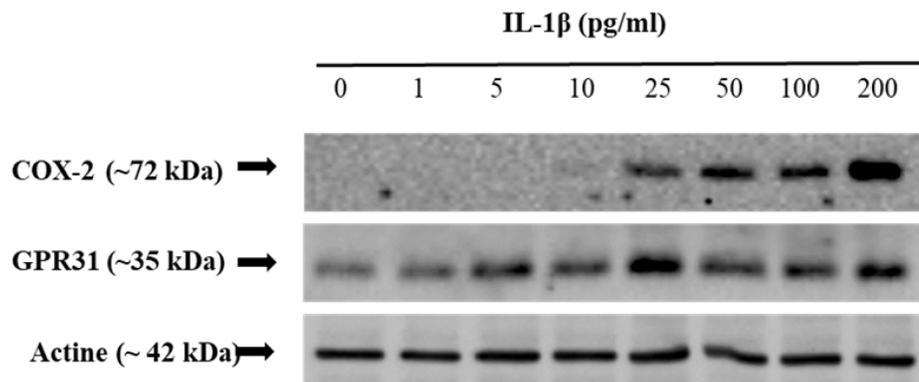
un facteur (ANOVA). Les valeurs significatives de  $p$  sont inférieures à 0,05. Les bandes sont représentatives de résultats similaires obtenus à partir de trois expériences différentes

## 5.2. Au niveau des synoviocytes

L'expression des protéines recherchées auprès des synoviocytes OA provenaient de trois (N=3) donneurs distincts. Dans des conditions de culture de base (sans IL-1 $\beta$ ), les synoviocytes OA expriment des niveaux quasi indétectables de COX-2 et de faibles niveaux de GRP31. Le traitement à l'IL-1 $\beta$  a augmenté l'expression des protéines COX-2, mais, avec GRP31, il s'est établi un plateau au fur et à mesure que la dose s'élevait. Cependant, l'expression de la COX-2 a augmenté à partir de 25 pg/ml pour atteindre un pic à 200 pg/ml, tandis que celle de GRP31 a augmenté à partir de 1 pg/ml, pour atteindre deux pics à 25 pg/ml et 200 pg/ml (Figure 24). L'IL-1 $\beta$  a induit de forte expression de COX-2 ( $p=0,023$ ), mais, entraîne une optimisation de l'expression de GRP31 aux concentrations de 25 pg/ml et 200 pg/ml ( $p=0,050$ ). En outre, le niveau de la  $\beta$ -actine n'a pas été modifié par le traitement à l'IL-1 $\beta$ .

### Figure 24

*Effet de l'IL-1 $\beta$  sur l'expression des protéines COX-2 et GPR31 dans les synoviocytes OA.*



Les synoviocytes ont été stimulés avec des doses croissantes d'IL-1 $\beta$  (pg/ml) pendant 24 h. Des lysats cellulaires ont été préparés et analysés pour les protéines COX-2 et GRP31 par Western blotting. Les différences significatives ont été étudiées par le test d'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs significatives de  $p$  sont inférieures à 0,05. Les bandes sont représentatives de résultats similaires obtenus à partir de trois expériences différentes.

## **Chapitre 4 - Discussion**

Dans ce projet, nous avons étudié le rôle du 12-HETE dans la régulation des réponses inflammatoires et cataboliques des tissus articulaires dans la pathogenèse de l'OA. Le 12-HETE est un métabolite synthétisé dans la voie des lipoxgénases par la 12-LOX qui sont des enzymes métabolisant les lipides exprimés dans tous les tissus métaboliquement actifs et qui régulent différents processus cellulaires par l'intermédiaire de leurs produits eicosanoïdes (Adili et al., 2017).

Nous avons démontré de manière préliminaire que la 12-HETE à 1  $\mu\text{M}$  n'influence pas la prolifération des chondrocytes et des synoviocytes en fonction de la dose. Cependant, dans une étude, le traitement des cellules épithéliales cornéennes avec 0,5  $\mu\text{M}$  12(S)-HETE pendant 24, 48 et 72 heures a produit une augmentation marquée de la prolifération, avec des augmentations significatives ( $p < 0,05$ ) survenant à 48 et 72 heures (Ottino et al., 2003), ce qui montre que notre produit a des propriétés prolifératives à des faibles concentrations. Dans notre étude nous avons évalué l'effet de 12-HETE sur la prolifération en fonction la dose, peut-être que si nous nous penchons sur la dépendance au temps, l'effet de 12-HETE serait différent. Une raison pour laquelle la 12-HETE serait sans effet au niveau de la prolifération chondrocytes, laisserait envisager une inhibition de l'activité de Runx2 par la 12-HETE, un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la différenciation et la prolifération des chondrocytes (Chen et al., 2014), bien qu'aucune étude n'ait encore révélé une telle corrélation. La prolifération étant une mesure du taux de croissance et de production de cellules filles d'une population cellulaire (Zhu & Thompson, 2019), elle peut servir d'outil de mesure pour la santé d'une population cellulaire et l'adéquation d'une construction ou d'un matériau pour la survie cellulaire (Hipfner & Cohen, 2004). Les synoviocytes fibroblastiques jouent un rôle important dans les processus inflammatoires (Farrajota et al., 2005), et elles sont capables de subir des changements de composition entraînant une hausse d'expression des gènes inflammatoires et la sécrétion de cytokines, et également un taux de prolifération rapide et une forte capacité d'invasion (Mustonen et al., 2023). Le fait que la 12-HETE n'ait exercé aucune influence sur la prolifération des synoviocytes est due au fait que les synoviocytes humains de type B de la PR sont capables d'exprimer l'ARNm 12-LOX de type plaquettaire conduisant à la synthèse de 12-HETE (Liagre et al., 1997), donc il s'est produit un effet de synergie entre la 12-HETE produite par les synoviocytes et celle apportée dans le milieu réactionnel durant notre test. Tenant compte des observations précédentes, nous pouvons alléguer la 12-HETE n'a pas d'effet dans les chondrocytes et les synoviocytes aux concentrations étudiées.

La migration cellulaire est un processus essentiel dans le développement et le maintien des organismes multicellulaires. Dans l'embryogenèse, des schémas complexes de migration cellulaire sont d'une grande importance à la formation normale des tissus. La cicatrisation des plaies implique la migration de plusieurs types de cellules, et la migration des leucocytes vers les ganglions lymphatiques et les tissus enflammés est nécessaire au développement des réponses immunitaires. La migration cellulaire se produit également dans de nombreuses maladies (Franz et al., 2002).

Nous avons démontré que la 12-HETE n'impactait pas la migration des chondrocytes et des synoviocytes arthrosiques. Cela n'est d'autant pas surprenant puisque dans des conditions homéostatiques, la migration cellulaire fait partie des fonctions des eicosanoïdes (Kulkarni et al., 2021) ce qui justifie le fait les cellules chondrocytaires et ceux de la synoviale ont continué à migrer dépendamment de la présence du 12-HETE. Cependant, ce résultat s'aligne avec les propriétés propres aux métabolites de la 12-LOX. Car, en effet, il est connu que la 12-HETE est un métabolite de la 12-LOX, mais, aussi de la 12/15-LOX (Napolitano, 2019; Singh & Rao, 2019), or la 12/15-LOX et ses métabolites auraient des effets protecteurs contre la dégradation du cartilage (Habouri et al., 2017). Ainsi la 12-HETE se comporte comme un agoniste pour la migration des chondrocytes et des synoviocytes.

Étant donné que la migration et la prolifération sont deux éléments nécessaires à la fermeture d'une plaie ou d'une brèche (Ammann et al., 2019) et compte tenu des observations sus citées, il convient de penser que la 12-HETE aurait des attributs chondroprotecteurs.

L'interleukine est une cytokine aux propriétés inflammatoires appartenant au système immunitaire innée ayant différentes manifestations systémiques lors de la réponse inflammatoire à savoir l'induction de la fièvre, la thrombopoïèse, la granulopoïèse ou encore le recrutement leucocytaire (Jamilloux et al., 2018). Dans le cartilage, l'IL-1 $\beta$  joue un rôle de régulateur du catabolisme des chondrocytes en augmentant la synthèse des enzymes cataboliques telles que les aggrécánases et les métalloprotéinases matricielles; une production d'autres médiateurs inflammatoires et en diminuant la synthèse de la matrice extracellulaire des chondrocytes (Jenei-Lanzl et al., 2019).

Dans notre étude, nous avons démontré qu'au niveau des chondrocytes OA, la 12-HETE induite par l'IL- 1 $\beta$  activait la production de COX-2, ce qui corrobore avec les résultats d'une étude montrant que la 12-HETE induit l'ARNm de la COX-2 et l'expression des protéines dans les cellules mésangiales du rat (Xu et al., 2006) et une autre étude révélait une corrélation entre

l'augmentation du 12-HETE et l'expression de la COX-2 dans le carcinome de la prostate (Shappell et al., 2001). Ces études démontrent l'existence d'une implication et collaboration entre la 12-HETE et l'augmentation de la COX-2 dans des maladies liées à un dysfonctionnement des fonctions métaboliques cellulaires.

Nous avons aussi démontré que la 12-HETE n'avait aucun effet sur MMP-13 et MMP-1. Il est connu que MMP-13 et MMP-1 sont des enzymes impliquées dans la dégradation du cartilage dans l'OA (Habouri et al., 2017). Dans une étude, il avait été démontré une corrélation entre la 12-HETE et son récepteur BLT2 dans la régulation positive de MMP-1 au niveau des kératinocytes humaines impliquées dans le vieillissement (Kim et al., 2010). Mais, en ce qui concerne de la relation entre 12-HETE et MMP-13, nous n'avons pas trouvé d'études qui en font allusion. Cependant, il a été démontré que le PPAR $\gamma$ , un récepteur potentiel du 12-HETE (Napolitano, 2019), induit par l'IL-1 $\beta$  inhibait l'expression de MMP-13 dans les chondrocytes humains (Fahmi et al., 2001). Dans cette étude, nous n'avons pas observé de changement sur l'expression de MMP13 et MMP-1 en présence la 12-HETE induite par l'IL-1 $\beta$ . Nos résultats ne nous permettent pas de déterminer si la 12(S)HETE joue un rôle positif ou négatif dans les chondrocytes arthrosiques.

Tenant compte de ce qui précède, nous pouvons dire que la 12-HETE induite par l'IL-1 $\beta$  n'a pas un effet bénéfique dans les chondrocytes arthrosiques.

L'AA est le substrat à partir duquel bon nombre de métabolites anti-inflammatoires et pro-résolutions sont synthétisés en occurrence les prostanoïdes et les LTs (Harwood, 2023), montrant ainsi l'existence de points communs entre ces familles de métabolites. Récemment il a été démontré que PPAR $\gamma$  et ses ligands étaient impliqués dans la régulation de PGE<sub>2</sub> des synoviocytes humains induites par l'IL-1 $\beta$  (Cheng et al., 2006). La synoviale est un tissu dont le tropisme en macrophages activés le rend favorable à l'inflammation (Manferdini et al., 2016; Milner et al., 2006). Dans une étude sur la variation des lipides pro- et anti-inflammatoires dans les synoviales des patients atteints de Polyarthrite Rhumatoïde (PR) causés par l'accroissement d'AGPI n-6, il a été révélé que les synoviocytes OA seraient moins inflammatoires que ceux de la PR du fait de qu'ils ne sont pas riche en AGPI n-6 comparé aux synoviocytes PR (Mustonen et al., 2023). Dans notre étude, nous avons démontré que la 12-HETE induite par l'IL-1 $\beta$  augmentait l'expression de COX-2 et n'avait pas d'influence sur l'expression conjointe de MMP-1 au niveau des synoviocytes OA. La forte expression de COX-2 serait corrélée avec la probable présence d'un grand nombre d'AGPI  $\omega$ -6

dans le tissu synovial. Dans cette étude, il a été démontré que RANTES/CCL5, une puissante chimiokine CC ayant un rôle important dans la pathogenèse de la PR, induit de manière dose-dépendante l'expression de MMP-1 et MMP-13 dans des monocouches et des micromasses tridimensionnelles (3D) des fibroblastes synoviaux de PR humaines (RASf), ce qui est corrélé à une augmentation de l'activité collagénase des MMPs. Cette activation par RANTES/CCL5 avait été observée dans les RASf, mais pas dans les SF arthrosiques (OASf) (Agere et al., 2017). Ceci laisse suggérer que 12-HETE aurait un effet pro-inflammatoire sans effet bénéfique du point de vue catabolique dans les synoviocytes arthrosiques.

Dans notre étude, nous avons représenté l'OA dans les cartilages humains sains et malades afin de distinguer les traits caractéristiques de l'OA au niveau tissulaire. Cette observation macroscopique du cartilage est une méthode fiable pour la classification du cartilage dégénéré et la détection de l'OA par ses propriétés histologiques selon le stade de la dégénérescence (Kleemann et al., 2005). Ainsi, nous avons pu observer la dégradation du protéoglycane matérialisée par la présence des irrégularités au niveau de la couche superficielle du cartilage OA, ce qui est partagé avec une étude dont l'objectif était de comparer des systèmes d'évaluation histopathologique du cartilage sur les articulations du genou humain à tous les stades du développement de l'OA (Pauli et al., 2012).

La GRP31 fait partie de la famille des RCPG, qui regroupe un grand nombre de récepteurs ayant des configurations presque similaires avec sept canaux transmembranaires qui lient des ligands spécifiques ou communs capable d'agir en tant qu'agonistes complets, partiels, inverses ou antagonistes. Ces ligands sont entre autres des lipides bioactifs, des amines biologiques et des chimiokines. Plusieurs RCPG demeurent des récepteurs dits orphelins et certains d'entre eux présentent une fonction constitutive, indépendante des ligands. L'activation des RCPG contrôle une multitude de fonctions cellulaires fondamentales telles que la prolifération, l'apoptose, la migration/la chimiotaxie et la différenciation. En effet, les RCPG jouent un rôle essentiel dans le réglage précis de l'inflammation, du cancer, de la vision, du goût, de l'olfaction, des fonctions cardiovasculaires et endocriniennes des organes (Napolitano, 2019). Il a été démontré que le 12-HETE, déclenche une grande variété de réponses cellulaires. Les diverses fonctions biologiques induites par le 12-HETE indiquent qu'il agit comme une molécule de signalisation essentielle dans la régulation des processus physiologiques. À la manière des RCPG de la membrane plasmique identifiés pour d'autres eicosanoïdes, il existe de fortes présomptions que la signalisation du 12-

HETE implique un RCPG de la membrane plasmique qui n'est pas clairement identifié (Guo et al., 2011).

La signalisation médiée par les GPCR est depuis longtemps impliquée dans la régulation de l'inflammation, et les GPCR peuvent servir de récepteurs pour de nombreux métabolites lipidiques (Husted et al., 2017). Dans notre étude, nous avons montré que le cartilage humain et celui du chien expriment GRP31. Nous avons utilisé l'analyse immunohistochimique et constaté que l'expression de la protéine GRP31 était élevée dans le cartilage de l'OA par rapport au cartilage normal. L'analyse de l'expression protéique de GRP31 par l'immunohistologie corrobore ces résultats, montrant des niveaux plus élevés de GRP31 dans les chondrocytes arthrosiques en absence d'IL-1 $\beta$ . Cela correspond aux résultats de deux études récentes révélant d'une part, le fait que la surexpression de GRP31 associée à la 12-HETE, favoriserait la thrombose artérielle dans les plaquettes humaines et les modèles murins, la prolifération des cellules tumorales et les métastases (Doren et al., 2021; Powell & Rokach, 2015) et d'un autre côté, sa désactivation modifierait la croissance du pancréas exocrine et serait nécessaire à la formation des cellules  $\beta$  (Hernandez-Perez et al., 2020). Au regard de ce qui précède, il est une évidence que GRP31, à l'instar du 12-HETER1 puisse être susceptible de jouer un rôle important dans d'autres pathologies, car le 12-HETE est un régulateur principal des processus inflammatoires qui affectent divers états pathologiques tels que le diabète et les troubles neurologiques (Honn et al., 2016). Dans notre étude, nous avons remarqué que le marquage émis par la coloration immuno-réactive positive pour GRP31 était principalement localisée dans les chondrocytes des couches superficielles du cartilage humain et celui du chien, cela corrobore avec les résultats d'une étude qui montre aussi que GRP31 s'exprimait plus dans les zones apicales que basales des CEI (Cartwright et al., 2021). Il est intéressant de noter que l'IL-1 $\beta$ , l'un des médiateurs les plus importants impliqués dans l'inflammation articulaire et les processus de dégradation, s'accumule dans les zones superficielles du cartilage humain. Cela suggère que l'IL-1 $\beta$  pourrait être un médiateur clé de l'expression de GRP31 dans les chondrocytes comme cela a été le cas avec mPGES-1 (Li et al., 2005).

Le choix porté sur le chien comme modèle animale se justifie par le fait que la structure de la morphologie articulaire et osseuse de ce dernier se rapproche plus de l'humain que pour celle de la souris. En effet, les chiens portant une pathologie méniscale spontanée sont reconnus d'avoir le potentiel d'être un excellent modèle pour l'étude des mécanismes de dégénérescence et les tests de

nouvelles stratégies de traitement tant bien pour les humains et les chiens eux-mêmes. De plus, le chien nous offre un modèle naturel de dégénérescence et de blessure approprié, surtout pour les approches biologiques et d'ingénierie tissulaire, où les réponses inflammatoires et cataboliques préexistantes influencent largement les résultats du traitement (Krupkova et al., 2018)

Afin de de confirmer l'expression de GRP31 dans les cellules articulaires OA, nous avons démontré que l'ARN de GRP31 était aussi présent dans les chondrocytes et les synoviocytes arthrosiques. En effet, il existe très peu d'études qui ont pu démontrer la présence de GRP31 dans les cellules OA. Une étude récente avait déjà montré l'expression de l'ARNm de GRP31 dans les cellules hépatiques atteintes de carcinome hépatocellulaire (CHC) à l'aide de la méthode de siRNA (Yang et al., 2019), bien que dans notre étude nous avons procédé par PCR quantitative pour le démontrer.

Dans notre étude, nous avons démontré l'expression de COX-2, iNOS et GRP31, induits par l'IL-1 $\beta$  dans les chondrocytes et les synoviocytes arthrosiques. Comme dans plusieurs études, nos résultats ont montré que des doses croissantes d'IL-1 $\beta$  entraînaient une augmentation de COX-2 et iNOS. Nous avons également démontré que l'IL-1 $\beta$  avait un effet différent sur le GRP31 dont l'expression augmentait à de faibles doses, mais, avait une tendance à diminuer à fortes doses. L'ambivalence de la réponse de récepteur, laisse sous-entendre qu'il pourrait avoir un effet à la fois pro- et anti-inflammatoire dans les chondrocytes et les synoviocytes OA. Or nous avons trouvé que la forte expression de la GRP31 dans le cartilage OA (dégradé) comparé au cartilage normal (non dégradé) n'était pas significative, ce qui nous permet de donner une direction sur la réponse de ce récepteur. En effet, l'IL-1 $\beta$  a réduit considérablement l'expression des médiateurs inflammatoires et a diminué l'expression de GRP31 selon la concentration. Ce résultat est similaire à celui trouvé sur la régulation du récepteur PPAR $\gamma$  dans l'OA. En effet, tout comme GRP31, PPAR $\gamma$  a aussi pour ligand la 12-HETE, or dans une étude, il a été montré que l'IL-1 supprimait l'expression de PPAR $\gamma$  dans les chondrocytes OA humains (Nebbaki et al., 2012). La diminution de la régulation de la GRP31 dans le cartilage des patients atteints d'OA suggère son implication dans la baisse locale de la production du 12-HETE et de la destruction des tissus. En effet, il a été démontré que le GPR31 est responsable de la lésion d'ischémie reperfusion (IR) hépatique médiée par le 12-HETE. Plus spécifiquement, le Knock Out (KO) du gène GPR31 dans la lignée cellulaire

d'hépatocytes humains L02 a permis d'inhiber l'activation de la signalisation de la protéine kinase C (PKC)-JNK induite par le 12-HETE (Zhang et al., 2018).

Par ailleurs, bien que ce travail soit préliminaire par rapport au rôle que peut jouer la 12-HETE dans la pathogénèse de l'OA, nous avons relevé quelques manquements qui auraient suscités un autre regard sur les résultats obtenus. En effet, nous n'avons pas utilisé des cellules provenant de donneurs non arthrosiques mais seulement celles des donneurs arthrosiques. Nous n'avons pas déterminé le niveau de la 12-HETE dans le liquide synovial des patients OA et normaux, mais nous avons juste traité les chondrocytes et les synoviocytes OA avec ledit produit. Nous n'avons pas évalué l'effet du sexe par rapport aux réponses obtenues, nous sommes seulement attardées sur le fait que nos échantillons étaient tous des patients OA. La taille des échantillons n'étaient pas assez représentative (N=3), des études supplémentaires avec un échantillon plus important sont nécessaires pour compléter les résultats de l'étude. D'autres part, ces résultats seraient bénéfiques s'ils étaient validés dans un modèle animal d'arthrose (injecter de l'arthrose et voir si elle module ou non l'arthrose).

## **Chapitre 5 – Conclusion et perspectives**

Les métabolites de la 12-LOXs sont des molécules qui ont des propriétés qui peuvent être bénéfiques dans certaines complications au sein de l'organisme à l'instar du 12-HETE, dont très peu de travaux ont évoqué son implication dans l'OA. Dans notre projet, il était question de déterminer le rôle du 12-HETE dans la pathogenèse de l'OA. Notre hypothèse était que la 12-HETE induit des réponses cataboliques et inflammatoires dans les tissus articulaires atteints d'OA. Nous avons démontré que la 12-HETE n'exerçait aucune influence sur la prolifération et la migration des chondrocytes et des synoviocytes OA. Elle stimulait la production de la COX-2 dans les chondrocytes et les synoviocytes arthrosiques lorsque exposé aussi à l'IL-1 $\beta$ , mais, était sans effet sur les métalloprotéinases MMP-1 et MMP-13. Nous avons également décrit comment se manifeste l'OA au sein des tissus articulaires humains, mais aussi, nous avons déterminé l'expression d'un récepteur du 12-HETE, le GRP31 dans les tissus articulaires normaux et arthrosiques de l'humain et du chien. Nous avons poussé nos investigations plus loin et nous avons déterminé qu'il y avait expression de l'ARNm et de la protéine de GRP31 dans les chondrocytes et les synoviocytes arthrosiques.

Au regard des résultats obtenus, nous pouvons dire que la 12-HETE n'est pas toxique et n'induit pas les enzymes cataboliques MMP1 et MMP13. En revanche, tout comme la plupart des métabolites de la 12-LOX, elle aurait des attributs pro- inflammatoires. Ce qui ne serait pas favorable au processus de résolution de l'OA. Cependant, l'identification de la présence du récepteur GRP31 dans le cartilage et les cellules arthrosiques préfigure l'existence d'un axe 12-HETE-GRP31, qui offrirait une issue thérapeutique favorable dans la lutte contre la pathogenèse de l'OA. Néanmoins, dans une étude future, nous pensons explorer d'autres médiateurs cataboliques et inflammatoires de l'OA, comme mPGES-1 et iNOS, pour mieux apprécier l'effet du 12-HETE et étudier en profondeur la voie de signalisation 12-HETE-GRP31 dans la pathogenèse de l'OA. Ces études offriront probablement un rapprochement un peu plus concret vers la découverte d'un traitement efficace contre l'OA.

## Références bibliographiques

- AAOS, A. A. o. O. S. (2023). *Arthritis of the Knee*. OrthoInfo. Retrieved February 2023 from <https://orthoinfo.org/en/diseases--conditions/arthritis-of-the-knee/>
- Adili, R., Tourdot, B. E., Mast, K., Yeung, J., Freedman, J. C., Green, A., Luci, D. K., Jadhav, A., Simeonov, A., Maloney, D. J., Holman, T. R., & Holinstat, M. (2017). First Selective 12-LOX Inhibitor, ML355, Impairs Thrombus Formation and Vessel Occlusion In Vivo With Minimal Effects on Hemostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(10), 1828-1839. <https://doi.org/doi:10.1161/ATVBAHA.117.309868>
- Agarwal, N. B., Bedi, G. O., Bhardwaj, S., Goyal, R., Guin, D., Jalali, R. K., Karwa, M., Khanna, B., Khurana, L. K., Kukreti, R., Narang, S., Nell, G. K. H., Olsson, S., Rai, M., Rasaily, D., Saha, N., Sharma, B., Sharma, S., Singh, G., . . . Vyas, P. (2018). List of Contributors. In D. Vohora & G. Singh (Eds.), *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research* (pp. xxi-xxii). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802103-3.00040-7>
- Agere, S. A., Akhtar, N., Watson, J. M., & Ahmed, S. (2017). RANTES/CCL5 Induces Collagen Degradation by Activating MMP-1 and MMP-13 Expression in Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01341>
- Allen, K. D., Thoma, L. M., & Golightly, Y. M. (2022). Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(2), 184-195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.04.020>
- Ammann, K. R., DeCook, K. J., Li, M., & Slepian, M. J. (2019). Migration versus proliferation as contributor to in vitro wound healing of vascular endothelial and smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*, 376(1), 58-66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.01.011>
- Ansari, M. Y., Ahmad, N., & Haqqi, T. M. (2020). Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother*, 129, 110452. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110452>
- Artru, F., McPhail, M. J. W., Triantafyllou, E., & Trovato, F. M. (2022). Lipids in Liver Failure Syndromes: A Focus on Eicosanoids, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and Lysophospholipids. *Front Immunol*, 13, 867261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867261>
- Babakhanova, G., Zimmerman, S. M., Pierce, L. T., Sarkar, S., Schaub, N. J., & Simon, C. G., Jr. (2022). Quantitative, traceable determination of cell viability using absorbance microscopy. *PLoS One*, 17(1), e0262119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262119>
- Bai, L.-K., Su, Y.-Z., Wang, X.-X., Bai, B., Zhang, C.-Q., Zhang, L.-Y., & Zhang, G.-L. (2022). Synovial Macrophages: Past Life, Current Situation, and Application in Inflammatory Arthritis [Systematic Review]. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.905356>
- Ball, H. C., Alejo, A. L., Samson, T. K., Alejo, A. M., & Safadi, F. F. (2022). Epigenetic Regulation of Chondrocytes and Subchondral Bone in Osteoarthritis. *Life*, 12(4), 582. <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/4/582>

- Barnett, R. (2018). Osteoarthritis. *The Lancet*, 391(10134), 1985. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31064-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31064-X)
- Berenbaum, F., Wallace, I., Lieberman, D., E., & Felson, D., T. (2018). Modern-day environmental factors in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 14(11), 674-681. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0073-x>
- Bortoluzzi, A., Furini, F., & Scirè, C. A. (2018). Osteoarthritis and its management - Epidemiology, nutritional aspects and environmental factors. *Autoimmunity Reviews*, 17(11), 1097-1104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.06.002>
- Bratthauer, G. L. (2010a). The Avidin–Biotin Complex (ABC) Method and Other Avidin–Biotin Binding Methods. In C. Oliver & M. C. Jamur (Eds.), *Immunocytochemical Methods and Protocols* (pp. 257-270). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_26)
- Bratthauer, G. L. (2010b). Processing of Tissue Culture Cells. In C. Oliver & M. C. Jamur (Eds.), *Immunocytochemical Methods and Protocols* (pp. 85-92). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_12)
- Brücher, B., & Jamall, I. (2019). Eicosanoids in carcinogenesis. *4open*, 2, 1-34. <https://doi.org/10.1051/fopen/2018008>
- Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N., & Martinez-Fierro, M. L. (2020). The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9739. <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9739>
- CARTUN, R. W., TAYLOR, C. R., & DABBS, D. J. (2021). Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. *Diagnostic Immunohistochemistry E-Book: Theranostic and Genomic Applications*, 1.
- Cartwright, I. M., Dowdell, A. S., Lanis, J. M., Brink, K. R., Mu, A., Kosteleccky, R. E., Schaefer, R. E. M., Welch, N., Onyiah, J. C., Hall, C. H. T., Gerich, M. E., Tabor, J. J., & Colgan, S. P. (2021). Mucosal acidosis elicits a unique molecular signature in epithelia and intestinal tissue mediated by GPR31-induced CREB phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(20), e2023871118. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2023871118>
- Chen, H., Ghorri-Javed, F. Y., Rashid, H., Adhami, M. D., Serra, R., Gutierrez, S. E., & Javed, A. (2014). Runx2 Regulates Endochondral Ossification Through Control of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(12), 2653-2665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbmr.2287>
- Cheng, S., Afif, H., Martel-Pelletier, J., Benderdour, M., Pelletier, J.-P., Hilal, G., Haraoui, P., Raynauld, J.-P., Choquette, D., & Fahmi, H. (2006). Association of polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  gene and osteoarthritis of the knee. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65(10), 1394-1397. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.051904>
- Cherifi, C., Monteagudo, S., & Lories, R. J. (2021). Promising targets for therapy of osteoarthritis: a review on the Wnt and TGF- $\beta$  signalling pathways. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 13, 1759720X211006959.
- Chevalier, X., & Richette, P. (2005). Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie*, 2(1), 41-58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.emcrho.2004.10.005>
- Chhonker, Y. S., Bala, V., & Murry, D. J. (2018). Quantification of eicosanoids and their metabolites in biological matrices: a review. *Bioanalysis*, 10(24), 2027-2046. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0173>

- Chou, C.-H., Jain, V., Gibson, J., Attarian, D. E., Haraden, C. A., Yohn, C. B., Laberge, R.-M., Gregory, S., & Kraus, V. B. (2020). Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Scientific Reports*, *10*(1), 10868. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67730-y>
- Chow, Y. Y., & Chin, K. Y. (2020). The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm*, *2020*, 8293921. <https://doi.org/10.1155/2020/8293921>
- Christoforakis, Z., Dermitzaki, E., Paflioti, E., Katrinaki, M., Deiktakis, M., H.Tosounidis, T., Ballalis, K., Tsatsanis, C., Venihaki, M., & Kontakis, G. (2022). Correlation of systemic metabolic inflammation with knee osteoarthritis. *Hormones*, *21*(3), 457-466. <https://doi.org/10.1007/s42000-022-00381-y>
- Conrozier, T., & Flipo, R. M. (2003). La prise en charge thérapeutique de l'arthrose en ce début de 3e millénaire.: 1re partie : le traitement pharmacologique. *La Revue de Médecine Interne*, *24*(3), 183-188. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0248-8663\(02\)00819-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0248-8663(02)00819-6)
- Cordingley, D. M., & Cornish, S. M. (2022). Omega-3 Fatty Acids for the Management of Osteoarthritis: A Narrative Review. *Nutrients*, *14*(16), 3362. <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/16/3362>
- Corpet, A. (2020). Épigénétique: nous sommes plus que la séquence de nos gènes. *Médecine et philosophie*.
- Das, D. M. K., Sahu, P. K., Rao, G., Khagga, M., & Silpavathi, L. (2014). Application of response surface method to evaluate the cytotoxic potency of *Ulva fasciata* Delile, a marine macro alga. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *21*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.02.003>
- Delplace, V., Boutet, M.-A., Le Visage, C., Maugars, Y., Guicheux, J., & Vinatier, C. (2021). Osteoarthritis: From upcoming treatments to treatments yet to come. *Joint Bone Spine*, *88*(5), 105206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2021.105206>
- Dong, L., Liu, Q., Gao, Y., Jia, H., Dai, W., Guo, L., Fan, H., Fan, Y., & Zhang, X. (2021). The effect of collagen hydrogels on chondrocyte behaviors through restricting the contraction of cell/hydrogel constructs. *Regenerative Biomaterials*, *8*(4). <https://doi.org/10.1093/rb/rbab030>
- Doren, L. V., Nguyen, N., Garzia, C., Fletcher, E. K., Stevenson, R., Jaramillo, D., Kuliopulos, A., & Covic, L. (2021). Lipid Receptor GPR31 (G-Protein–Coupled Receptor 31) Regulates Platelet Reactivity and Thrombosis Without Affecting Hemostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *41*(1), e33-e45. <https://doi.org/doi:10.1161/ATVBAHA.120.315154>
- Dragos, D., Gilca, M., Gaman, L., Vlad, A., Iosif, L., Stoian, I., & Lupescu, O. (2017). Phytomedicine in Joint Disorders. *Nutrients*, *9*(1), 70. <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/1/70>
- Duchez, A.-C., Boudreau, L. H., Naika, G. S., Bollinger, J., Belleannée, C., Cloutier, N., Laffont, B., Mendoza-Villaruel, R. E., Lévesque, T., Rollet-Labelle, E., Rousseau, M., Allaëys, I., Tremblay, J. J., Poubelle, P. E., Lambeau, G., Pouliot, M., Provost, P., Soulet, D., Gelb, M. H., & Boilard, E. (2015). Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A<sub>2</sub>-IIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(27), E3564-E3573. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1507905112>
- Erivan, R., Villatte, G., Eymond, G., Mulliez, A., Descamps, S., & Boisgard, S. (2018). Intérêt de la sonication des explants en orthopédie dans le diagnostic des infections de matériel. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique*, *104*(4), 304-309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rcot.2018.01.006>

- Fahmi, H., Di Battista, J. A., Pelletier, J.-P., Mineau, F., Ranger, P., & Martel-Pelletier, J. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activators inhibit interleukin-1 $\beta$ -induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 44(3), 595-607. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200103\)44:3<595::AID-ANR108>3.0.CO;2-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1529-0131(200103)44:3<595::AID-ANR108>3.0.CO;2-8)
- Farrajota, K., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Afif, H., Pelletier, J.-P., Li, X., Ranger, P., & Fahmi, H. (2005). Inhibition of interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis & Rheumatism*, 52(1), 94-104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/art.20714>
- Farrán, A., Valverde-Franco, G., Tío, L., Lussier, B., Fahmi, H., Pelletier, J.-P., Bishop, P. N., Monfort, J., & Martel-Pelletier, J. (2018). In vivo effect of opticin deficiency in cartilage in a surgically induced mouse model of osteoarthritis. *Scientific Reports*, 8(1), 457. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18047-w>
- Fernández-Cuadros, M. E., Pérez-Moro, O. S., Albaladejo-Florín, M. J., Tobar-Izquierdo, M. M., Magaña-Sánchez, A., Jiménez-Cuevas, P., & Rodríguez-de-Cía, J. (2022). Intra Articular Ozone Modulates Inflammation and Has Anabolic Effect on Knee Osteoarthritis: IL-6 and IGF-1 as Pro-Inflammatory and Anabolic Biomarkers. *Processes*, 10(1), 138. <https://www.mdpi.com/2227-9717/10/1/138>
- Franz, C. M., Jones, G. E., & Ridley, A. J. (2002). Cell Migration in Development and Disease. *Developmental Cell*, 2(2), 153-158. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00120-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00120-X)
- Fujii, Y., Liu, L., Yagasaki, L., Inotsume, M., Chiba, T., & Asahara, H. (2022). Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6316. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/11/6316>
- Gaigeard, N., Blanchard, F., Vinatier, C., Le Goff, B., Guicheux, J., & Boutet, M.-A. (2023). Macrophages et inflammation articulaire : quoi de neuf dans l'arthrose ? *Revue du Rhumatisme*, 90(3), 305-312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rhum.2022.12.015>
- Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A., & Hurrell, J. G. R. (2004). Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology*, 66(1), 10.18.11-10.18.24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1008s66>
- Gavini, K., & Parameshwaran, K. (2022). *Western Blot*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/abstract/MED/31194430>
- <http://europepmc.org/books/NBK542290>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290>
- Ghandour, R. A., Pisani, D. F., & Amri, E. Z. (2016). Acide arachidonique et prostaglandines : impact sur la formation des adipocytes blancs, bruns et bruns/beiges. *Obésité*, 11(2), 159-167. <https://doi.org/10.1007/s11690-016-0525-x>
- Gilroy, D. W. (2021). Resolving inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 21(10), 620-621. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00597-w>
- Grosseron. (2023). *Trypsine (agent enzymatique de dissociation cellulaire)*. GROSSERON SAS. Retrieved 05 mars 2023 from [https://www.grosseron.com/trypsine-\(agent-enzymatique-de-dissociation-cellulaire\)\\_86-1407-1-2888-1-11720.html](https://www.grosseron.com/trypsine-(agent-enzymatique-de-dissociation-cellulaire)_86-1407-1-2888-1-11720.html)
- Guo, D., Tan, W., Wang, F., Lv, Z., Hu, J., Lv, T., Chen, Q., Gu, X., Wan, B., & Zhang, Z. (2008). Analyse protéomique du cartilage articulaire humain : expression différentielle de protéines

- dans le genou de patients arthrosiques. *Revue du Rhumatisme*, 75(7), 619-624. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rhum.2007.12.009>
- Guo, Y., Zhang, W., Giroux, C., Cai, Y., Ekambaram, P., Dilly, A.-k., Hsu, A., Zhou, S., Maddipati, K. R., Liu, J., Joshi, S., Tucker, S. C., Lee, M.-J., & Honn, K. V. (2011). Identification of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR31 as a Receptor for 12-(S)-Hydroxyeicosatetraenoic Acid\*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(39), 33832-33840. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216564>
- Gupta, B., Yang, G., Petrauskene, O., & Key, M. (2023). Recent Advances in Chromogens for Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, 2593, 35-50. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2811-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2811-9_3)
- Habouri, L., El Mansouri, F. E., Ouhaddi, Y., Lussier, B., Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J., Benderdour, M., & Fahmi, H. (2017). Deletion of 12/15-lipoxygenase accelerates the development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(10), 1719-1728. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.07.001>
- Harwood, J. L. (2023). Polyunsaturated Fatty Acids: Conversion to Lipid Mediators, Roles in Inflammatory Diseases and Dietary Sources. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8838. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/10/8838>
- Hawker, G. A., & King, L. K. (2022). The Burden of Osteoarthritis in Older Adults. *Clinics in Geriatric Medicine*, 38(2), 181-192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cger.2021.11.005>
- He, Y., Wu, Z., Xu, L., Xu, K., Chen, Z., Ran, J., & Wu, L. (2020). The role of SIRT3-mediated mitochondrial homeostasis in osteoarthritis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03497-9>
- Hernandez-Perez, M., Kulkarni, A., Samala, N., Sorrell, C., El, K., Haider, I., Mukhtar Aleem, A., Holman, T. R., Rai, G., Tersey, S. A., Mirmira, R. G., & Anderson, R. M. (2020). A 12-lipoxygenase-Gpr31 signaling axis is required for pancreatic organogenesis in the zebrafish. *The FASEB Journal*, 34(11), 14850-14862. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.201902308RR>
- Hipfner, D. R., & Cohen, S. M. (2004). Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), 805-815. <https://doi.org/10.1038/nrm1491>
- Honn, K. V., Guo, Y., Cai, Y., Lee, M.-J., Dyson, G., Zhang, W., & Tucker, S. C. (2016). 12-HETER1/GPR31, a high-affinity 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid receptor, is significantly up-regulated in prostate cancer and plays a critical role in prostate cancer progression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(6), 2360-2369. <https://doi.org/10.1096/fj.201500076>
- Hoveidaei, A. H., Nakhostin-Ansari, A., Chalian, M., Roshanshad, A., Khonji, M. S., Mashhadiagha, A., Pooyan, A., & Citak, M. (2023). Burden of knee osteoarthritis in the Middle East and North Africa (MENA): an epidemiological analysis from 1990 to 2019. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s00402-023-04852-8>
- Hunter, D. J., & Bierma-Zeinstra, S. (2019). Osteoarthritis. *The Lancet*, 393(10182), 1745-1759. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)
- Husted, A. S., Trauelsen, M., Rudenko, O., Hjorth, S. A., & Schwartz, T. W. (2017). GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metabolism*, 25(4), 777-796. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.008>

- Ivanov, I., Kuhn, H., & Heydeck, D. (2015). Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*, 573(1), 1-32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.073>
- Jamilloux, Y., Bourdonnay, E., Gerfaud-Valentin, M., Py, B. F., Lefeuvre, L., Barba, T., Broussolle, C., Henry, T., & Sève, P. (2018). Interleukine-1, inflammasome et maladies auto-inflammatoires. *La Revue de Médecine Interne*, 39(4), 233-239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.revmed.2016.07.007>
- Jang, S., Lee, K., & Ju, J. H. (2021). Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2619. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2619>
- Jenei-Lanzl, Z., Meurer, A., & Zaucke, F. (2019). Interleukin-1 $\beta$  signaling in osteoarthritis – chondrocytes in focus. *Cellular Signalling*, 53, 212-223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.10.005>
- Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record*, 295(3), 369-371. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ar.22424>
- Jiang, Y., & Tuan, R. S. (2015). Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 11(4), 206-212. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.200>
- Jones, A., & Doherty, M. (1992). The treatment of osteoarthritis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 33(4), 357-363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1992.tb04052.x>
- Juneja, P., Munjal, A., & Hubbard, J. B. (2023). Anatomy, Joints. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507893/>
- Kim, C., Ryu, H. C., & Kim, J. H. (2010). Low-dose UVB irradiation stimulates matrix metalloproteinase-1 expression via a BLT2-linked pathway in HaCaT cells. *Exp Mol Med*, 42(12), 833-841. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.12.086>
- Kim, S. W., Roh, J., & Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*, 50(6), 411-418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>
- Kleemann, R. U., Krockner, D., Cedraro, A., Tuischer, J., & Duda, G. N. (2005). Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade). *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(11), 958-963. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.06.008>
- Knab, K., Chambers, D., & Krönke, G. (2022). Synovial Macrophage and Fibroblast Heterogeneity in Joint Homeostasis and Inflammation [Review]. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.862161>
- Koley, D., & Bard, A. J. (2010). Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39), 16783-16787. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1011614107>
- Krupkova, O., Smolders, L., Wuertz-Kozak, K., Cook, J., & Pozzi, A. (2018). The Pathobiology of the Meniscus: A Comparison Between the Human and Dog [Review]. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00073>

- Kuhn, H., Banthiya, S., & van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 308-330. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.10.002>
- Kulkarni, A., Nadler, J. L., Mirmira, R. G., & Casimiro, I. (2021). Regulation of Tissue Inflammation by 12-Lipoxygenases. *Biomolecules*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biom11050717>
- Kurien, B. T. (2021). Basics of Western Blotting. In B. T. Kurien (Ed.), *Western Blotting for the Non-Expert* (pp. 7-21). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-70684-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-70684-5_2)
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). Western Blotting: An Introduction. In B. T. Kurien & R. H. Scofield (Eds.), *Western Blotting: Methods and Protocols* (pp. 17-30). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5)
- Lagorce, T., Buxeraud, J., & Guillot, X. (2016). Les traitements de l'arthrose. *Actualités Pharmaceutiques*, 55(555), 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2016.02.006>
- Li, T., Peng, J., Li, Q., Shu, Y., Zhu, P., & Hao, L. (2022). The Mechanism and Role of ADAMTS Protein Family in Osteoarthritis. *Biomolecules*, 12(7), 959. <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/7/959>
- Li, X., Afif, H., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Ranger, P., & Fahmi, H. (2005). Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *The Journal of Rheumatology*, 32(5), 887-895. <https://www.jrheum.org/content/jrheum/32/5/887.full.pdf>
- Liagre, B., Vergne, P., Rigaud, M., & Beneytout, J. L. (1997). Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes. *FEBS Letters*, 414(1), 159-164. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00904-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00904-6)
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329-333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R., & Goldring, M. B. (2012). Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatism*, 64(6), 1697-1707. <https://doi.org/10.1002/art.34453>
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*, 283(45), 30433-30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>
- Maayah, Z. H., & El-Kadi, A. O. S. (2016). The role of mid-chain hydroxyeicosatetraenoic acids in the pathogenesis of hypertension and cardiac hypertrophy. *Archives of Toxicology*, 90(1), 119-136. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1620-8>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, 1897, 289-298. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)
- Manferdini, C., Paoletta, F., Gabusi, E., Silvestri, Y., Gambari, L., Cattini, L., Filardo, G., Fleury-Cappellesso, S., & Lisignoli, G. (2016). From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0983-4>
- Martel-Pelletier, J. (2004). Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 31-33. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2003.10.002>
- Martel-Pelletier, J., Paiement, P., & Pelletier, J.-P. (2023). Magnetic resonance imaging assessments for knee segmentation and their use in combination with machine/deep

- learning as predictors of early osteoarthritis diagnosis and prognosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 15, 1759720X231165560. <https://doi.org/10.1177/1759720x231165560>
- Martel-Pelletier, J., & Pelletier, J.-P. (2022). Is there a mitochondrial DNA haplogroup connection between osteoarthritis and elite athletes? A narrative review. *RMD Open*, 8(2), e002602. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2022-002602>
- Maskrey, B. H., Rushworth, G. F., Law, M. H., Treweek, A. T., Wei, J., Leslie, S. J., Megson, I. L., & Whitfield, P. D. (2014). 12-hydroxyeicosatetraenoic acid is associated with variability in aspirin-induced platelet inhibition. *Journal of Inflammation*, 11(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12950-014-0033-4>
- Mathiessen, A., & Conaghan, P. G. (2017). Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*, 19(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1229-9>
- McClurg, O., Tinson, R., & Troeberg, L. (2021). Targeting Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Pharmaceuticals*, 14(2), 126. <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/2/126>
- Mehana, E.-S. E., Khafaga, A. F., & El-Blehi, S. S. (2019). The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review. *Life Sciences*, 234, 116786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116786>
- Milner, J. M., Kevorkian, L., Young, D. A., Jones, D., Wait, R., Donell, S. T., Barksby, E., Patterson, A. M., Middleton, J., Cravatt, B. F., Clark, I. M., Rowan, A. D., & Cawston, T. E. (2006). Fibroblast activation protein alpha is expressed by chondrocytes following a pro-inflammatory stimulus and is elevated in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 8(1), R23. <https://doi.org/10.1186/ar1877>
- Mohd Yunus, M. H., Lee, Y., Nordin, A., Chua, K. H., & Bt Hj Idrus, R. (2022). Remodeling Osteoarthritic Articular Cartilage under Hypoxic Conditions. *Int J Mol Sci*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105356>
- Molnar, V., Matišić, V., Kodvanj, I., Bjelica, R., Jeleč, Ž., Hudetz, D., Rod, E., Čukelj, F., Vrdoljak, T., Vidović, D., Starešinić, M., Sabalić, S., Dobričić, B., Petrović, T., Antičević, D., Borić, I., Košir, R., Zmrzljak, U. P., & Primorac, D. (2021). Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9208. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/17/9208>
- Mora, J. C., Przkora, R., & Cruz-Almeida, Y. (2018). Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *Journal of Pain Research*, 11, 2189-2196. <https://doi.org/10.2147/JPR.S154002>
- Moravek, M., Matejova, J., & Spakova, T. (2023). Soluble and EV-Associated Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Knee Osteoarthritis Pathology and Detection. *Life*, 13(2), 342. <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/2/342>
- Morgan, L. T., Thomas, C. P., Kühn, H., & O'Donnell, V. B. (2010). Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase. *Biochemical Journal*, 431(1), 141-148.
- Motta, F., Barone, E., Sica, A., & Selmi, C. (2023). Inflammaging and Osteoarthritis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 64(2), 222-238. <https://doi.org/10.1007/s12016-022-08941-1>
- Muir, E., De Winter, F., Verhaagen, J., & Fawcett, J. (2019). Recent advances in the therapeutic uses of chondroitinase ABC. *Experimental Neurology*, 321, 113032. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113032>

- Mustonen, A.-M., Tollis, S., Käkälä, R., Sihvo, S. P., Palosaari, S., Pohjanen, V.-M., Yli-Hallila, A., Lehenkari, P., & Nieminen, P. (2023). Increased n-6 Polyunsaturated Fatty Acids Indicate Pro- and Anti-Inflammatory Lipid Modifications in Synovial Membranes with Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. <https://doi.org/10.1007/s10753-023-01816-3>
- Napolitano, M. (2019). The role of the 12(S)-HETE/GPR31/12-HETER axis in cancer and ischemia–reperfusion injury. *Biochemical Society Transactions*, 47(2), 743-754. <https://doi.org/10.1042/bst20180635>
- Nayeem, M. A. (2018). Role of oxylipins in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), 1142-1154. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.24>
- Nebbaki, S.-S., El Mansouri, F. E., Afif, H., Kapoor, M., Benderdour, M., Duval, N., Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J., & Fahmi, H. (2012). Egr-1 contributes to IL-1-mediated down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, 14(2), R69. <https://doi.org/10.1186/ar3788>
- Nedunchezhiyan, U., Varughese, I., Sun, A. R., Wu, X., Crawford, R., & Prasad, I. (2022). Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis [Review]. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.907750>
- Okuno, T., & Yokomizo, T. (2018). Biological functions of 12(S)-hydroxyheptadecatrienoic acid as a ligand of leukotriene B4 receptor 2. *Inflammation and Regeneration*, 38(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0087-4>
- Oseni, A. O., Butler, P. E., & Seifalian, A. M. (2013). Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. *Journal of Surgical Research*, 181(1), 41-48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.05.087>
- Ottino, P., Taheri, F., & Bazan, H. E. P. (2003). Growth factor-induced proliferation in corneal epithelial cells is mediated by 12(S)-HETE. *Experimental Eye Research*, 76(5), 613-622. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00003-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00003-4)
- Pace, S., Sautebin, L., & Werz, O. (2017). Sex-biased eicosanoid biology: Impact for sex differences in inflammation and consequences for pharmacotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 145, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.128>
- Pal, A. (2022). Immunohistochemistry. In A. Pal (Ed.), *Protocols in Advanced Genomics and Allied Techniques* (pp. 95-117). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1818-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1818-9_5)
- Pauli, C., Whiteside, R., Heras, F. L., Nestic, D., Koziol, J., Grogan, S. P., Matyas, J., Pritzker, K. P. H., D’Lima, D. D., & Lotz, M. K. (2012). Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(6), 476-485. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.12.018>
- Pers, Y.-M., & Breton, A. (2021). Que nous apporte l’IRM dans l’arthrose (diagnostic, pronostic, traitement) ? Focus sur le genou arthrosique. *Revue du Rhumatisme Monographies*, 88(2), 123-128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2021.02.002>
- Porro, B., Songia, P., Squellerio, I., Tremoli, E., & Cavalca, V. (2014). Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: a neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 964, 26-40.
- Powell, W. S., & Rokach, J. (2015). Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived

- from arachidonic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 340-355. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.10.008>
- Railhac, J., RICHARDI, G., SANS, N., FOURCADE, D., & PAUL, J. (2009). IMAGERIE DE L'ARTHROSE. *Observatoire du mouvement: les fondamentaux de l'arthrose*, 6-9.
- Rannou, F., Sellam, J., & Berenbaum, F. (2010). Physiopathologie de l'arthrose : conceptions actuelles. *La Presse Médicale*, 39(11), 1159-1163. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2010.09.001>
- Razdan, A., Main, N., Chiu, V., Shackel, N., de Souza, P., Bryant, K., & Scott, K. (2021). Targeting the eicosanoid pathway in hepatocellular carcinoma. *American journal of cancer research*, 11, 2456-2476. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8263695/>
- Santé Canada. (2020). *L'arthrose au Canada*. Agence de santé publique du Canada (ASPC), organisme de publication. Retrieved 28 June 2022 from <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/maladies-et-affections/arthrose.html>
- Santé Québec. (2022). *Taux de prévalence de l'arthrite*. Ministère de la Santé et des Services sociaux,. <https://www.msss.gouv.qc.ca/professionnels/statistiques-donnees-sante-bien-etre/statistiques-de-sante-et-de-bien-etre-selon-le-sexe-volet-national/taux-de-prevalence-de-l-arthrite/#:~:text=En%202013-2014%2C%20au%20Qu%2C%2010%2C%25%20des%20personnes,dans%20le%20groupe%20de%2045%2C%2064%20ans.>
- Schneider, N., Lejeune, J.-P., Deby-Dupont, G., & Serteyn, D. (2007). Le rôle des synoviocytes dans l'articulation diarthrodiale enflammée. *Annales De Medecine Veterinaire*, 151.
- Shamekh, A., Alizadeh, M., Nejadghaderi, S. A., Sullman, M. J. M., Kaufman, J. S., Collins, G. S., Kolahi, A.-A., & Safiri, S. (2022). The Burden of Osteoarthritis in the Middle East and North Africa Region From 1990 to 2019 [Original Research]. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.881391>
- Shappell, S. B., Manning, S., Boeglin, W. E., Guan, Y. F., Roberts, R. L., Davis, L., Olson, S. J., Jack, G. S., Coffey, C. S., Wheeler, T. M., Breyer, M. D., & Brash, A. R. (2001). Alterations in lipoxygenase and cyclooxygenase-2 catalytic activity and mRNA expression in prostate carcinoma. *Neoplasia*, 3(4), 287-303. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900166>
- Singh, N. K., & Rao, G. N. (2019). Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Progress in Lipid Research*, 73, 28-45. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.11.001>
- Société de l'arthrite du Canada. (2023). *Qu'est ce que l'arthrite ?* © Société de l'arthrite du Canada. Retrieved 05 mars 2023 from <https://arthrite.ca/a-propos-de-l-arthrite/qu-est-ce-que-l-arthrite>
- Sun, C.-C., Zhou, Z.-q., Yang, D., Chen, Z.-l., Zhou, Y.-y., Wen, W., Feng, C., Zheng, L., Peng, X.-Y., & Tang, C.-F. (2021). Recent advances in studies of 15-PGDH as a key enzyme for the degradation of prostaglandins. *International Immunopharmacology*, 101, 108176. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108176>
- Sun, Y., Ma, J., Li, D., Li, P., Zhou, X., Li, Y., He, Z., Qin, L., Liang, L., & Luo, X. (2019). Interleukin-10 inhibits interleukin-1 $\beta$  production and inflammasome activation of microglia in epileptic seizures. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1452-1>
- Sutradhar, B., Park, J., Hong, G., & Kim, G. (2010). Effects of Trypsinization on Viability of Equine Chondrocytes in Cell Culture. *Pakistan Veterinary Journal*, 30.

- Tager, A. M., & Luster, A. D. (2003). BLT1 and BLT2: the leukotriene B4 receptors. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69(2), 123-134. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(03\)00073-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0952-3278(03)00073-5)
- Valderrabano, V., & Steiger, C. (2011). Treatment and Prevention of Osteoarthritis through Exercise and Sports. *Journal of Aging Research*, 2011, 374653. <https://doi.org/10.4061/2011/374653>
- Valdes, A. M. (2020). Metabolic syndrome and osteoarthritis pain: common molecular mechanisms and potential therapeutic implications. *Osteoarthritis and Cartilage*, 28(1), 7-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.06.015>
- van den Bosch, M. H. J. (2018). Inflammation in osteoarthritis: is it time to dampen the alarm(in) in this debilitating disease? *Clinical and Experimental Immunology*, 195(2), 153-166. <https://doi.org/10.1111/cei.13237>
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In I. A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 237-245). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
- Wallace, I. J., Bendele, A. M., Riew, G., Frank, E. H., Hung, H. H., Holowka, N. B., Bolze, A. S., Venable, E. M., Yegian, A. K., Dingwall, H. L., Carmody, R. N., Grodzinsky, A. J., & Lieberman, D. E. (2019). Physical inactivity and knee osteoarthritis in guinea pigs. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(11), 1721-1728. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.07.005>
- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., Hu, J., Fleming, I., & Wang, D. W. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 94. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>
- Wang, T., Fu, X., Chen, Q., Patra, J. K., Wang, D., Wang, Z., & Gai, Z. (2019). Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3683. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/15/3683>
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A., & Szukiewicz, D. (2014). The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, 2014, 561459. <https://doi.org/10.1155/2014/561459>
- Wood, I., Trostchansky, A., & Rubbo, H. (2020). Structural considerations on lipoxygenase function, inhibition and crosstalk with nitric oxide pathways. *Biochimie*, 178, 170-180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.021>
- Xu, Z. G., Li, S. L., Lanting, L., Kim, Y. S., Shanmugam, N., Reddy, M. A., & Natarajan, R. (2006). Relationship between 12/15-lipoxygenase and COX-2 in mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 69(3), 512-519. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000137>
- Yang, F., Zhang, Y., Ren, H., Wang, J., Shang, L., Liu, Y., Zhu, W., & Shi, X. (2019). Ischemia reperfusion injury promotes recurrence of hepatocellular carcinoma in fatty liver via ALOX12-12HETE-GPR31 signaling axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 489. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1480-9>
- Yao, Q., Wu, X., Tao, C., Gong, W., Chen, M., Qu, M., Zhong, Y., He, T., Chen, S., & Xiao, G. (2023). Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01330-w>

- Yucesoy, B., Charles, L. E., Baker, B., & Burchfiel, C. M. (2015). Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: a review. *Work*, 50(2), 261-273. <https://doi.org/10.3233/wor-131739>
- Yunus, M. H. M., Nordin, A., & Kamal, H. (2020). Pathophysiological Perspective of Osteoarthritis. *Medicina*, 56(11), 614. <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/11/614>
- Zeng, J., Franklin, D. K., Das, A., & Hirani, V. (2023). The effects of dietary patterns and food groups on symptomatic osteoarthritis: A systematic review. *Nutrition & Dietetics*, 80(1), 21-43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1747-0080.12781>
- Zhai, G. (2019). Alteration of Metabolic Pathways in Osteoarthritis. *Metabolites*, 9(1), 11. <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/1/11>
- Zhang, X.-J., Cheng, X., Yan, Z.-Z., Fang, J., Wang, X., Wang, W., Liu, Z.-Y., Shen, L.-J., Zhang, P., Wang, P.-X., Liao, R., Ji, Y.-X., Wang, J.-Y., Tian, S., Zhu, X.-Y., Zhang, Y., Tian, R.-F., Wang, L., Ma, X.-L., . . . Li, H. (2018). An ALOX12–12-HETE–GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia–reperfusion injury. *Nature Medicine*, 24(1), 73-83. <https://doi.org/10.1038/nm.4451>
- Zheng, L., Zhang, Z., Sheng, P., & Mobasher, A. (2021). The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis. *Ageing Res Rev*, 66, 101249. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101249>
- Zhu, J., & Thompson, C. B. (2019). Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(7), 436-450. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0123-5>