

Université de Montréal

**L'implication des systèmes PA/plasmine et IGF/IGFBPs
dans la sclérose de l'os sous-chondral arthrosique**

Par

George Hilal

Programme des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D)

en sciences biomédicales

Juillet, 1999

© George Hilal



W

4

158

2000

√ 013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
**L'implication des systèmes PA/plasmine et IGF/IGFBPs
dans la sclérose de l'os sous-chondral arthrosique**

Présentée par :
George Hilal
Programme des sciences biomédicales
Faculté de médecine

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président du jury :	Dr Christiane Malo
Membre du jury :	Dr Jean-Pierre Raynauld
Examineur externe :	Dr Arthur J. de Brum-Fernandes
Directeur de recherche :	Dr Daniel Lajeunesse
Co-directrice de recherche :	Dr Johanne Martel-Pelletier

Sommaire

Caractérisée surtout par une dégradation du cartilage, l'arthrose est une maladie articulaire qui montre également une sclérose de l'os sous-chondral et une formation d'ostéophytes. Au stade clinique, cette pathologie progressive atteint environ 60% des personnes âgées de 65 ans et plus. La dégradation du cartilage qui accompagne cette maladie est la manifestation clinique la plus importante et la plus étudiée au niveau moléculaire. Par contre, la sclérose de l'os sous-chondral était toujours considérée comme secondaire ou comme un phénomène de compensation suite à l'érosion du cartilage. Cependant, la recherche fondamentale intensive sur le cartilage n'a toujours pas réussi à identifier le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la dégradation du cartilage. Ainsi, le traitement qui existe présentement se limite à calmer la douleur des patients. Par ailleurs, les études visant à comprendre le rôle de l'os sous-chondral, qui fait parti des tissus touchés par cette maladie, ont été toujours marginales.

Notre hypothèse générale est qu'un défaut dans le métabolisme de l'os sous-chondral pourrait contribuer au déclenchement et/ou à la progression de l'arthrose. Ce défaut expliquerait la sclérose osseuse de l'os sous-chondral observée chez ces patients, situation qui serait alors responsable de la détérioration du cartilage via soit; i) un (des) messenger(s) chimique(s), ii) l'imposition d'une contrainte mécanique sur le cartilage, ou iii) les deux précédents.

De manière à démontrer notre hypothèse générale, nous avons utilisé des extraits d'explants *ex vivo* et nous avons mis au point une technique pour cultiver les ostéoblastes provenant du plateau tibial médial de patients arthrosiques ou d'individus normaux. Au tout début de nos travaux nous avons démontré que, grâce à la mesure de marqueurs spécifiques, les ostéoblastes provenant de patients arthrosiques auraient un phénotype altéré lorsque comparé aux normaux. Ainsi, au niveau des explants d'os sous-chondral, nos données montrent que l'activité de la phosphatase alcaline était augmentée dans les ostéoblastes arthrosiques avant et après une stimulation avec la 1,25 (OH)₂ D₃ (métabolite actif de la vitamine D₃). La même observation a été notée pour l'ostéocalcine suite à une stimulation à la 1,25 (OH)₂ D₃ chez les ostéoblastes arthrosiques. Par ailleurs, les ostéoblastes arthrosiques ont montré une résistance à la stimulation par la PTH et la prostaglandine E₂ (PGE₂), leur taux de synthèse de l'AMPc (Adénosine 3', 5' monophosphate cyclique) étant 50% et 100% inhibé versus les ostéoblastes normaux.

Une altération dans la voie de signalisation de la PTH pourrait être la cause de cette inhibition de synthèse d'AMPc chez les ostéoblastes arthrosiques. Toutefois, une stimulation directe de l'adénylate cyclase avec de la forskoline, produit qui court-circuite le récepteur à la PTH et la protéine Gs, a ramené le niveau de l'AMPc à la normale, démontrant que l'activité de l'adénylate cyclase est intacte dans les ostéoblastes arthrosiques. Un traitement à la toxine de choléra qui ribosyle la protéine Gs n'a toutefois pas réussi à augmenter le niveau de l'AMPc après stimulation avec la PTH, ce qui signifie que l'activité de la protéine Gs est partiellement et/ou totalement inhibée. Au contraire, la stimulation de la protéine Gi (la protéine G inhibitrice) par la toxine de Pertussis a complètement inhibé la formation de l'AMPc après stimulation avec la PTH indiquant que la protéine Gi est intacte. Par la suite, la protéine Gs fût l'objet d'une quantification par western blot qui n'a révélé aucun changement au niveau de la quantité de cette protéine versus les ostéoblastes normaux. La quantification du récepteur de la PTH à l'aide d'une étude de liaison avec du ¹²⁵I-PTH a montré une diminution de 50% du niveau de récepteurs à la PTH. Cette diminution pourrait être causée par une désensibilisation hétérologue par la PGE₂. En effet, les ostéoblastes arthrosiques synthétisent plus de PGE₂ que les ostéoblastes normaux et l'inhibition de la synthèse de la prostaglandine par le Naproxen a ramené à la normale le niveau de formation de l'AMPc après stimulation avec la PTH. Par ailleurs, le niveau d'ARNm du récepteur à la PTH évalué par RT-PCR semi-quantitatif était diminué. Le ratio avec le glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) dans les ostéoblastes arthrosiques était de 25 à 65 % plus faible que pour les ostéoblastes normaux, le niveau d'inhibition variant en parallèle avec la sévérité de la maladie. Ceci indique que l'expression du récepteur à la PTH était diminuée dans les cellules arthrosiques.

Nos résultats ont également montré que l'activité du système PA/Plasmine, le premier système à initier la résorption osseuse, est inhibé dans l'os sous-chondral arthrosique ce qui pourrait entraîner une diminution de la résorption osseuse. Le niveau protéique et l'activité de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et du facteur de croissance de type insulinique-1 (IGF-1) sont tous les deux augmentés dans les explants arthrosiques comparativement aux explants normaux, tandis que le niveau de la protéine inhibitrice du plasminogène (PAI-1) pour sa part était inchangée. Afin de vérifier si les modifications observées avec les explants arthrosiques étaient vraiment dûes à un défaut

dans les ostéoblastes arthrosiques eux-mêmes, nous avons repris ces expériences avec ces cellules. Les niveaux d'uPA (activité et protéine) et d'IGF-1, dans les surnageants des ostéoblastes arthrosiques ont montré une augmentation significative comparativement aux ostéoblastes normaux. Par contre, le niveau de l'inhibiteur du PA (PAI-1) était similaire entre arthrose et normal. Puisque les systèmes d'uPA/plasmine et d'IGF-1/IGFBP sont tous deux impliqués dans la résorption et/ou la formation osseuse, et que des travaux récents démontraient une interrelation possible de ces deux systèmes, nous avons étudié cette question chez les ostéoblastes arthrosiques. L'ajout d'IGF-1 diminua significativement ($P < 0.05$) le niveau d'uPA seulement dans les ostéoblastes arthrosiques. Au contraire, l'uPA n'a pas modifié le niveau de l'IGF-1 dans les ostéoblastes normaux ni dans les ostéoblastes arthrosiques. Suite à une stimulation avec l'IGF-1, l'activité basale de l'uPA fut augmentée dans les ostéoblastes arthrosiques, tandis qu'aucun changement n'était observé dans les ostéoblastes normaux. L'ajout de plasminogène a fortement augmenté l'activité de l'uPA via un phénomène de rétro-action positive causée par la génération de la plasmine qui peut à son tour activer l'uPA latent en uPA actif. Le mécanisme de rétroaction positive fut inhibé par le PAI-1 et l' α_2 -antiplasmine. Le traitement des ostéoblastes arthrosiques avec l'IGF-1 a inhibé le phénomène de rétroaction positive et ceci d'une façon dose-dépendante, ce facteur de croissance n'ayant aucun effet chez les ostéoblastes normaux. Cette inhibition ne peut être due à une modification du niveau de PAI-1 parce que le niveau de cette protéine n'a révélé aucun changement après le traitement avec l'IGF-1. L'ajout d'IGF-1 a aussi diminué l'activité de la plasmine, dosée par l'hydrolyse d'un substrat spécifique, dans les ostéoblastes arthrosiques mais pas dans les ostéoblastes normaux. En résumé nos travaux ont montré que les ostéoblastes arthrosiques avaient un métabolisme altéré. En plus de montrer des changements à la réponse de marqueurs spécifiques, ces cellules pathologiques présentaient une diminution au niveau des récepteurs à la PTH et une réponse anormale au système uPA/plasmine à leur traitement avec l'IGF-1.

Cette observation est appuyée par la diminution du nombre de récepteurs à la PTH dans les ostéoblastes, une situation qui est aussi en accord avec une diminution possible de la résorption osseuse. Si ces observations *in vitro* se transposent *in vivo*, ceci signifie que la sclérose de l'os sous-chondral pourrait être due en partie à la diminution de la résorption

osseuse. Par ailleurs, l'augmentation du niveau d'IGF-1 et son rôle dans le contrôle négatif de la rétroaction positive du système uPA/Plasmine pourrait aussi contribuer à augmenter la formation osseuse et réduire la résorption osseuse respectivement. La sclérose de l'os sous-chondral pourrait alors jouer un rôle clef dans le déclenchement et la progression de l'arthrose.

Table des matières

PAGES TITRES.....	I
SOMMAIR.....	III
TABLE DE MATIÈRES.....	VII
LISTE DE FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
REMERCIEMENTS.....	VX
A. INTRODUCTION	
I. Une vieille histoire.....	2
II. L'arthrite rhumatoïde.....	3
III. L'arthrose.....	5
III.1. La classification de l'arthrose.....	5
III.2. Épidémiologie.....	6
III.3. Démographie.....	7
III.4. Les facteurs de risques et associés.....	8
III.4.1. L'oestrogène.....	8
III.4.2. L'obésité.....	8
III.4.3. La densité osseuse.....	9
III.4.4. L'hypermobilité des articulations.....	9
III.4.5. La cigarette.....	11
III.4.6. Est-ce que l'ostéoporose protège contre l'arthrose?.....	11
III.5. La pathologie de l'arthrose.....	12
III.5.1. Le cartilage normal.....	12
III.5.2. Le cartilage arthrosique.....	13
IV. Le tissu osseux normal.....	19
IV.1. La structure de l'os normal.....	19
IV.1.1. L'os compact.....	19
IV.1.2. L'os trabéculaire.....	20
IV.2. Le remodelage osseux.....	20
IV.2.1. Les ostéoblastes.....	22

IV.2.2. Les ostéoclastes.....	22
IV.3. La régulation du remodelage osseux.....	23
IV.3.1. L'hormone parathyroïdienne.....	24
IV.3.2. La calcitonine.....	25
IV.3.3. La vitamine D.....	25
IV.3.4. Les facteurs de croissance de type insulinique.....	26
IV.3.5. L'activateur du plasminogène.....	29
IV.3.5.1. La régulation du système PA/plasmine dans l'os.....	30
IV.3.5.2. Le rôle potentiel de l'uPA dans l'os.....	31
IV.4. L'os arthrosique.....	33
IV.4.1. L'os sous-chondral arthrosique.....	33
IV.4.1.1. L'os sous-chondral dans l'arthrose du genou.....	36
IV.4.2. L'arthrose chez les modèles expérimentaux.....	37
IV.4.3. La composition biochimique de l'os arthrosique.....	38
IV.4.4. L'arthrose : une maladie primaire de l'os !?!.....	39
V. Hypothèse de recherche.....	42

B. MANUSCRITS

Manuscrit 1 : OSTEOBLAST-LIKE CELLS FROM HUMAN SUBCHONDRAL OSTEOARTHRITIC BONE DEMONSTRATE AN ALTERED PHENOTYPE IN VITRO : Possible role in subchondral bone sclerosis.....	46
---	----

Manuscrit 2 : ABNORMAL REGULATION OF UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR BY INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 IN HUMAN OSTEOARTHRITIC SUBCHONDRAL OSTEOBLASTS.....	56
---	----

Manuscrit 3 : ABNORMAL EXPRESSION OF PARATHYROID HORMONE (PTH) RECEPTOR IN HUMAN OSTEOARTHRITIC OSTEOBLASTS MAY EXPLAIN ALTERED RESPONSE TO PTH CHALLENGE.....	90
--	----

C. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	123
-----------------------------------	-----

D. DISCUSSION.....	128
E. CONCLUSION.....	148
F. RÉFÉRENCES.....	155

Liste des figures

Figure 1	La structure du cartilage articulaire.....	14
Figure 2	La composition du cartilage articulaire.....	15
Figure 3	Structure microscopique de l'os compact.....	21
Figure 4	Les modifications morphologiques de l'os et du cartilage lors de l'arthrose.....	34
Figure 5	Les modifications morphologiques de l'os et du cartilage lors de l'arthrose (suite).....	35
Figure 6	Schéma résumant l'interaction entre les deux systèmes uPA/plasmine et IGF-1/IGFBP.....	135
Figure 7	Schéma explicatif de la désensibilisation homologue et hétérologue du récepteur à la PTH.....	141

Manuscrit 1 :

Figure 1	Production of cAMP in response to hormonal stimulation in human primary osteoblast-like cells.....	49
Figure 2	Cellular alkaline phosphatase activity of primary osteoblast-like cells....	49
Figure 3	Secretion of intact osteocalcin by human primary osteoblast-like cell cultures.....	50
Figure 4	Urokinase plasminogen activator abundance and enzymatic activity.....	50
Figure 5	Insulin-like growth factor-1 release in conditioned media from subchondral bone explants and in primary osteoblast-like cell cultures....	51

Manuscrit 2 :

Figure 1	Effect of IGF-1 treatment on uPA and PAI-1 production by normal and OA human primary osteoblasts.....	82
Figure 2	Dose-response curve of basal uPA activity measured using a selective substrate (DL-Val-Leu-Arg- pNA) in response to IGF-1 treatment.....	83
Figure 3	Time-response curve of the effect of IGF-1 on basal uPA activity by OA Osteoblasts.....	84
Figure 4	Selective inhibition of basal uPA activity by protease inhibitors.....	85
Figure 5	Comparison of PAI-1-dependent basal and plasminogen-stimulated uPA	

	activity in confluent normal and OA osteoblasts.....	86
Figure 6	Dose-response curve of plasminogen-stimulated uPA activity measured using a selective substrate in response to IGF-1 treatment.....	87
Figure 7	Representative zymograph of plasminogen activator from normal and OA Osteoblasts.....	88
Figure 8	Direct determination of plasmin activity in normal and OA culture Medium.....	89

Manuscrit 3 :

Figure 1	Effect of cholera toxin and pertussis toxin treatments on PTH-dependent cAMP formation by osteoarthritic osteoblasts.....	117
Figure 2	Representative Western blot analysis of Gs protein levels in normal and OA osteoblasts.....	118
Figure 3	Abundance of PTH receptors in Normal and OA osteoblasts.....	119
Figure 4	Evaluation of PTH receptor mRNA abundance in normal and OA Osteoblasts.....	120
Figure 5	Production of PGE ₂ by normal and OA osteoblasts and role of PGE ₂ levels on PTH-dependent cAMP formation by these cells.....	121
Figure 6	Effect of IGF-1 signalling blockade on PTH receptors in OA osteoblasts.....	122

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES :

Figure R.S.1.....	124
Figure R.S.2.....	126

Liste des abréviations

AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messenger
BMD	densité minérale osseuse
EGF	facteur de croissance fibroblastique
IGF-1	facteur de croissance de type insulinique de type 1
IGFBP	protéine liante de l'IGF-1
IL-1 α	interleukine de type 1- α
KD	kilo dalton
MMP	métalloprotéinase matricielle
PAI-1	protéine liante de l'activateur du plasminogène
PGE ₂	prostaglandine de type E ₂
PTH	hormone parathyroïdienne
scuPA	activateur du plasminogène de type urokinase en simple chaîne
TGF- β	transforming growth factor de type β
TIMP	inhibiteur des métalloprotéinases matricielles
TNF- α	tumor necrosis factor de type α
tPA	activateur du plasminogène de type tissulaire
uPA	activateur du plasminogène de type urokinase

Remerciements

C'est avec beaucoup de plaisir que je tiens à remercier ici tous ceux qui m'ont aidé au cours de cette thèse.

Tout d'abord, ma profonde reconnaissance va au docteur Daniel Lajeunesse qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui a dirigé de près ma formation doctorale. Les grandes qualités du Dr Lajeunesse ont fait de lui une personne extraordinaire. Mille mercis Daniel pour ton grand coeur, ta délicatesse, ta grande disponibilité, ton encouragement et pour ton énorme aide. Ta compétence, ton sérieux, ton efficacité et ton humour ont fait de toi à la fois un excellent directeur et aussi un bon ami. Encore une fois Daniel, merci.

Je voudrais également remercier chaleureusement ma co-directrice Dr Johanne Martel-Pelletier qui m'a accueilli dans son unité de recherche et qui m'a supporté financièrement dans les deux premières années de mes études. Grâce à elle et au Dr Jean-Pierre Pelletier, directeur de l'unité de recherche en arthrose, j'ai eu des discussions scientifiques enrichissantes et j'ai pu découvrir le grand monde international de la rhumatologie.

Je n'oublierai jamais l'ambiance agréable de notre laboratoire. Un grand merci à Mme Aline Delalandre pour son humour, sa belle personnalité et son aide technique. À notre nouvelle arrivée, Stéphanie Dubois, je souhaite tout le succès possible dans ses études doctorales. Ça m'a vraiment fait plaisir de la côtoyer pendant les quelques mois qui me restait au laboratoire.

Pour mener à bien un projet, il nous faut compter sur l'expertise et la collaboration de nombreuses personnes. Je remercie

particulièrement Dr Ginette Tardif qui a été une personne ressource très appréciée en biologie moléculaire. Un grand merci aussi au personnel de l'unité de recherche en arthrose qui était toujours disponible pour me débarrasser lors de mes petits problèmes techniques.

Au delà du travail, il y a l'amitié. Merci à Nada Aladdin et à Nathalie Saha pour leur amitié sincère.

Finalement, il me reste à remercier infiniment ma merveilleuse famille pour le support moral et l'aide de tout genre. Merci à mon père Youssef, ma mère Janette, mon frère Antoine, ma soeur Rita, mon beau-frère Wagih, sans oublier le sourire de mes neveux Jean-Pierre et Andrew.

*'Le commencement de la sagesse,
C'est la crainte de l'Éternel.'
Psaumes 111\10*

A:INTRODUCTION





The Royal Mineral Water Hospital, now known as the Royal National Hospital for Rheumatic Diseases, opened in Bath, United Kingdom, in 1742 for the relief of the beggars of Bath who suffered from rheumatic diseases. In the same year, artist William Hoare created this painting, which depicts the hospital's first physician and first surgeon examining patients at an early clinic combining rheumatology and orthopaedics.

The hand of the woman has features typical of rheumatoid arthritis, according to Professor Jan Dequeker, Professor of Rheumatology at Ziekenhuis University in Leuven, Belgium, and an authority on the depiction of rheumatic diseases in the visual arts. The man in the painting has paralysis, probably due to lead poisoning, noted fairly frequently in contemporary hospital records. According to Dequeker, "the right hand appears to be swollen ... and there is a swelling at the back of the left hand with the fingers in the flexion position." The child's hands are also swollen. The rash on his right hand, described in the painting's title as "leprosy," was more likely psoriasis, impetigo, or scabies.

References

Arthritis and Rheumatism. 1975;18:187-188.
Appelboom T ed. Art, History and Antiquity of Rheumatic Diseases. Brussels: Elsevier; 1987:31-37.

"Dr. William Oliver and Mr. Jeremiah Peirce, Examining patients afflicted with Rheumatism, Paralysis and Leprosy" (1742) by William Hoare, Esq.; Royal National Hospital for Rheumatic Diseases, Bath, United Kingdom.



Le simple mot 'arthrite' fait peur, évoque le spectre de la douleur, du vieillissement, de la dépendance, d'une réduction de la motilité. Le mot arthrite ne reflète pas une seule maladie, mais plus de cent formes, dont chacune met en cause une ou plusieurs articulations du corps humain. C'est une maladie jusqu'à présent incurable, et peut se traiter par différentes approches et médicaments pour diminuer la douleur et permettre aux patients d'être plus autonomes.

Le radical *arth* vient du grec arthron, qui veut dire 'articulation' et la terminaison *ite* signifie inflammation ou infection. Donc, théoriquement le mot arthrite voudrait dire 'inflammation de l'articulation'. Or ce n'est pas toujours le cas : dans plusieurs types d'arthrite, l'articulation n'est pas enflammée. C'est pourquoi l'on pourrait plus justement parler de 'maladie des articulations' (Lorig et al, 1991)

I. Une vieille histoire

Ça ne date pas d'hier. L'arthrite est une vieille maladie connue depuis des siècles, on peut dire des milliers d'années. Les "archéologues médicaux" ont retracé l'existence de l'arthrose dans l'ère paléolithique (Rogers et al, 1983) il y a environ 2 million d'années. L'ère paléolithique est la première période de la préhistoire, caractérisée par l'apparition puis le développement de 'l'industrie' de la pierre. Les chercheurs ont comparés, à l'aide de rayon X, les squelettes paléolithiques avec les patients arthrosiques modernes et ont trouvés des changements dégénératifs osseux similaires. Pour l'arthrite rhumatoïde les évidences historiques ne sont pas aussi claires comme dans le cas de l'arthrose. Toutefois la littérature historique médicale et non médicale traitant des sujets sur les maladies des articulations ne semblent pas décrire l'arthrite rhumatoïde clairement avant l'an 1800 (Dieppe et al, 1987). De plus, les squelettes de l'ère paléolithique ne montrent pas

clairement des signes de cette maladie (Rogers et al, 1983). Plusieurs paléopathologistes croiront que l'arthrite rhumatoïde existe depuis le "nouveau monde" soit depuis 3000-5000 ans (Rothschild et al, 1990). Ces derniers suggèrent aussi que l'arthrite rhumatoïde, comme la syphilis, a traversé l'atlantique en 1492 en provenance de l'Europe. Les adeptes de cette théorie pensent qu'une infection virale serait la cause de cette maladie. Ces auteurs postulent que cette infection est causée par un virus nouvellement muté (Dequeker et al, 1987). En examinant des oeuvres d'art de peinture, des rhumatologues curieux et intéressés par l'histoire des ces maladies, ont observé des caractéristiques des maladies rhumatismales chez les personnages peints. Plusieurs peintures montrant des évidences de maladies rhumatismales sont reproduites dans cette thèse. Tout récemment, le fameux magazine américain "Time" (18 avril 1998) a publié un article sur des momies égyptiennes de 2000 ans, trouvées par une équipe d'archéologues. Ces momies, examinées aux rayons X, montraient une difformité osseuse et des formes d'arthrite. Ancienne ou nouvelle, l'arthrite est une maladie qui touche encore une vaste proportion de la population mondiale de notre siècle. Plusieurs formes d'arthrite existent mais l'arthrite rhumatoïde et l'arthrose représentent les types principaux retrouvés chez les patients.

II. L'arthrite rhumatoïde

Plusieurs médecins l'appellent 'maladie rhumatoïde' pour souligner qu'elle touche non seulement les articulations, mais aussi d'autres organes du corps humain. La racine *rhum* nous renvoie aux douleurs, aux raideurs et à la fatigue qui accompagnent fréquemment cette maladie. L'arthrite rhumatoïde est considérée comme une maladie auto-immune dans laquelle une réponse immunitaire pathologique attaque la membrane synoviale, le

cartilage et l'os, résultant en une destruction de l'articulation et par la suite en une invalidité permanente. Comme toutes les maladies auto-immunes, l'arthrite rhumatoïde est plus fréquente chez la femme suggérant un rôle important des hormones sexuelles dans le déclenchement ou la progression de cette maladie (Ziffe et al, 1990). Lors de cette maladie, une invasion par les macrophages, les cellules T et d'autres cellules plasmatiques se fait au niveau de la membrane synoviale (Janossy et al, 1981; Cush et al, 1988). Ceci induit des altérations de la membrane synoviale, une destruction progressive du cartilage et de l'os principalement par l'activation des métalloprotéases matricielles via des cytokines. Il y a aussi un développement de nouveaux vaisseaux sanguins et des évidences indiquant une inflammation systémique telle l'augmentation des protéines de la phase aiguë. La mortalité chez les personnes atteintes de cette maladie augmente avec la sévérité de cette dernière (Pincus et al, 1993).

La cause de cette maladie demeure toujours inconnue. Plusieurs hypothèses ont été élaborées pour essayer d'expliquer la cause de cette maladie. Les deux théories les plus courantes parlent d'une infection et d'une prédisposition génétique. Ces 'anciennes/nouvelles' théories suggèrent toutes que l'inflammation des articulations, en particulier de la membrane synoviale n'est qu'une résultante de l'attaque du système immunitaire pour détruire un antigène toujours inconnu pour le moment, causant ainsi une inflammation de la membrane et par la suite une destruction du cartilage et de l'os (Cornelia et al 1997). La deuxième théorie porte sur la prédisposition génétique. Plusieurs maladies, comme les maladies cardiaques et le diabète sont considérées comme des maladies génétiques, et l'arthrite rhumatoïde en est une autre qui s'ajoute sur cette liste. Contrairement aux autres maladies génétiques reliées à un défaut dans un seul gène et dont la transmission respecte la loi mendélienne, l'arthrite rhumatoïde est une maladie

génétiqnement très complexe. Cette dernière ne serait pas reliée à un défaut dans un seul gène mais à un environnement génétique dans lequel plusieurs facteurs sont hérités, chacun de ces facteurs seul étant par ailleurs considéré normal (Cornelia et al, 1997). L'arthrite rhumatoïde n'étant pas le sujet de cette thèse, ce qu'il faut retenir, c'est que l'inflammation est la cause de la dégradation du cartilage et de l'os chez les patients atteints de l'arthrite rhumatoïde. À l'opposé dans l'arthrose, la dégradation du cartilage et les modifications osseuses surviennent probablement avant le déclenchement de l'inflammation, cette dernière n'apparaît être que secondaire dans cette maladie.

III. L'arthrose

L'arthrose est la maladie articulaire la plus commune et qui touche les articulations de personnes âgées de 60 ans et plus. Bien que l'étiologie de cette maladie peut être multiple, cette dernière présente les changements morphologiques, biologiques et cliniques. Les changements morphologiques sont présents non seulement au niveau du cartilage mais aussi au niveau de toute l'articulation incluant, l'os sous-chondral, les ligaments, la membrane synoviale et le muscle périarticulaire. Le cartilage articulaire se dégrade progressivement, il y a apparition de fibrillations, de fissures et d'ulcères qui entraînent même la disparition complète du cartilage. De manière concomitante, l'os adjacent au cartilage appelé os sous-chondral, s'épaissit au fur et à mesure que la maladie progresse.

III.1. La Classification de l'arthrose

Il y a environ un siècle, des études pathologiques et l'examen radiographique ont permis la division de l'arthrite chronique en deux formes majeures : arthropique et

hypertrophique (Goldthwait et al, 1904). La forme arthropique, ou l'arthrite rhumatoïde, était caractérisée par l'inflammation de la membrane synoviale, la dégradation généralisée du cartilage, la dégradation de l'os sous-chondral et l'ostéoporose. La forme hypertrophique, ou arthrose, est caractérisée par une dégradation locale du cartilage, l'épaississement de l'os sous-chondral et la formation d'os marginal (ou ostéophytes).

Par la suite, des critères de classification de l'arthrose idiopathique du genou ont été développés permettant ainsi aux investigateurs de classer la maladie en se basant sur une combinaison de plusieurs paramètres cliniques, radiologiques et des analyses biochimiques (Altman et al, 1986). Ainsi, en utilisant les critères cliniques seulement, la présence de douleur au genou accompagnée d'au moins trois des six critères incluant : l'âge (plus que 50 ans), raideur matinale de l'articulation moins de 30 minutes, crepitus, douleur osseuse, élargissement osseux et échauffement non palpable donnent 95% de sensibilité et 69% de spécificité. De plus, la présence d'ostéophytes, la douleur au genou et au moins un des trois critères incluant l'âge (plus de 50 ans), la raideur de l'articulation de moins de 30 minutes et de crépitus donnent 91 % de sensibilité et 86% de spécificité. Cependant ces critères de classification ne sont pas conçus et ne devront pas être utilisés comme critères de diagnostic, parce que ces critères n'apparaissent pas applicables à tous les cas de cette maladie. Par ailleurs l'utilisation de l'arbre algorithmique donne l'opportunité de substituer des variables cliniques et de maintenir un taux élevé de sensibilité et de spécificité.

III.2. Épidémiologie

L'un des phénomènes les plus importants du vingtième siècle est l'augmentation de la longévité de la population. Aujourd'hui, approximativement 80 % de la population vivra

à un âge de 70 ans et plus. En effet, en 1983 et pour la première fois dans l'histoire des États-Unis, la population âgée de 65 ans et plus était plus grande que la population adolescente (Ghadirian et al, 1991). Cette population vieillissante est estimée à 16 million d'ici l'an 2050 aux États-Unis seulement. Cette situation va donc certainement entraîner une augmentation des problèmes de santé reliés à l'âge. En effet, des études d'autopsie révèlent une évidence universelle de la dégradation du cartilage chez les personnes âgées de 65 ans et plus (Cooper, 1994) et aussi des évidences définitives de l'arthrose du genou dans une proportion de 60 à 70 % des personnes de 65 ans et plus (Felson, 1988). L'arthrose est la cause principale d'invalidité et consomme une portion élevée des sommes consacrées aux soins de la santé en Amérique du Nord, et est classée parmi les trois premiers problèmes de santé dans les pays développés (Dieppe, 1991).

Au Canada, plus de 3 millions d'individus souffrent d'arthrose (1/10 de la population), et ce nombre augmentera d'un million au 10 ans selon la revue *Arthroscopie* (1998), publiée par la Société d'Arthrite. Cette maladie coûte actuellement 17.8 milliards de dollars par année suite à l'invalidité des personnes atteintes d'arthrose et d'autres formes d'arthrite.

III.3. Démographie

La différence raciale dans la prévalence et la distribution des articulations affectées par l'arthrose peut être reliée à la différence d'emploi, de style de vie et de la prédisposition génétique. Les études épidémiologiques ont rapporté que les chinois du sud (Hoaglund et al, 1973), les noirs de l'Afrique du sud (Solomon et al, 1975) et les indiens de l'est (Mukhopadhaya et al, 1967) ont une incidence plus faible d'arthrose de la hanche que les européens et les américains de race blanche. Par ailleurs, les japonais ont une incidence élevée d'arthrose secondaire comparativement à l'arthrose primaire de la hanche. Ceci est

probablement relié à des antécédents congénitaux des maladies de la hanche incluant la dislocation congénitale et la dysplasie acétabulaire chez le peuple Japonais (Hoaglund et al, 1985)

III.4. Les facteurs de risques et associés

Les facteurs de risques et associés qui sont attribués à l'arthrose incluent le niveau d'oestrogène, la cigarette, l'ostéoporose, l'âge, l'obésité (Felson et al 1988 et 1991), la densité minérale élevée de l'os (Felson et, 1993; Nevitt et al, 1995), l'instabilité et l'hypermobilité de l'articulation (Howell et al, 1992), un trauma de l'articulation, l'immobilisation (Helminen et al, 1987; Panush et al, 1994; Videman et al, 1976), la présence de cristaux dans le liquide synovial ou dans le cartilage (Felson et al, 1993), et la surutilisation de l'articulation (Anderson et al, 1988).

III.4.1. L'oestrogène

Une étude épidémiologique a suggéré que l'excès d'oestrogène est un facteur de risque dans le développement de l'arthrose généralisée (Samanta et al, 1993).

III.4.2. L'obésité

Le rôle de l'obésité dans le développement de l'arthrose est contradictoire. Plusieurs études suggèrent que l'obésité en soi n'est pas un facteur qui contribue au développement de l'arthrose (Goldin et al, 1976). D'autres études ont montré une augmentation de la fréquence de l'arthrose chez les personnes obèses, particulièrement au niveau des articulations portantes (Leach et al, 1973; Hartz et al, 1986). De plus, une étude récente basée sur les données du 'National Health and nutrition examination survey' a montré que

l'obésité est fortement associée à l'arthrose du genou surtout chez les femmes (Hartz et al, 1986). Cette dernière étude suggère que la principale raison de l'association de l'arthrose avec l'obésité soit surtout l'ajout du stress mécanique résultant du poids élevé.

III.4.3. La densité osseuse

La relation entre la densité minérale osseuse et l'arthrose a été décrite par plusieurs équipes dont celle de Salomon et al (1982). Cette dernière équipe a montré que les patients dont la masse osseuse est diminuée sont disposés à développer une fracture du cou. Au contraire, l'augmentation de la masse osseuse est positivement corrélée avec l'arthrose. La densité minérale osseuse (BMD) chez les patients arthrosiques du genou, mesurée par l'absorption de photons, est augmentée dans le plateau tibial comparativement aux individus normaux (Malson et al, 1994). Contrairement aux plateaux tibiaux, la même équipe a montré que la BMD dans le condyle fémoral des mêmes patients est diminuée comparativement aux individus normaux. Cette augmentation de la densité minérale osseuse de l'ensemble du plateau tibial arthrosique est probablement due au fait que l'os devient plus épais. Par contre, des données récentes suggèrent que la minéralisation serait diminuée par unité de surface (Carlson et al, 1996). Ainsi, la densité totale serait élevée en raison de la sclérose du tissu ostéoïde, et non de son niveau de minéralisation. Donc, l'os arthrosique augmente de volume mais sa minéralisation diminue.

III.4.4. L'hypermobilité des articulations

L'implication de ce facteur de risque dans le développement ou la progression de l'arthrose est incertaine. Les études qui supportent la relation entre l'hypermobilité du

genou et l'arthrose ont démontré que l'arthrose de la main des droitiers est plus sévère comparativement à la main gauche (Acheson et al, 1970). De plus, cette même observation est vraie pour la sur-utilisation des articulations reliées aux métiers, comme l'arthrose de la colonne vertébrale des mineurs (Schloma et al, 1955) et l'arthrose de la cheville des chauffeurs d'autobus (Lawrence et al, 1969). Cependant cette hypothèse est controversée puisque les utilisateurs de compresseurs pneumatiques (Burke et al, 1977) et les coureurs de marathon (Puramen et al, 1975) ne sont pas particulièrement affectés par l'arthrose. Par contre l'apparition de l'arthrose du genou chez les joueurs de soccer après un trauma est très fréquente et souvent prématurée (Kujala et al, 1995). De plus, les femmes athlètes, dont la plupart étaient des coureuses, ont montré vers la fin de leur carrière plus de signes radiographiques d'arthrose que les femmes non athlétiques du même âge (Spector et al, 1996). La déstabilisation de l'articulation est toujours liée au développement de l'arthrose. Cette déstabilisation est due parfois à une faiblesse musculaire. En effet, les personnes identifiées par radiographie du genou comme arthrosique, avec ou sans symptôme, avaient aussi le muscle du quadriceps plus faible que le muscle de personnes sans radiographie positive d'arthrose (Slemenda et al, 1997). Des études préliminaires suggèrent que le fait d'entraîner régulièrement les muscles des membres inférieurs protège contre l'arthrose du genou (Slemenda et al, 1996). Finalement, une étude très récente a démontré qu'un modeste exercice en danse aérobique peut améliorer la stabilité du genou et diminuer d'une façon significative la douleur de l'articulation (Ettinger et al, 1997). Cette même équipe suggère que la danse aérobique modérée devrait faire partie du traitement de l'arthrose du genou.

III.4.5. La cigarette

Plusieurs études épidémiologiques ont établi un lien protecteur entre la cigarette et le développement de l'arthrose de genou (Samanta et al, 1993; Felson et al, 1989). La fumée de la cigarette aurait un effet protecteur sur le cartilage et un effet indirect via l'induction de l'ostéoporose, qui en soi, semble protéger de l'arthrose (Coper et al, 1991; Hart et al, 1994).

III.4.6. Est-ce que l'ostéoporose protège contre l'arthrose?

L'ostéoporose et l'arthrose sont deux maladies musculo-squelettiques reliées à l'âge et sont associées avec une morbidité et une mortalité considérables. Les patients qui souffrent d'ostéoporose après la ménopause et ceux qui sont arthrosiques forment deux populations complètement différentes (Dequeker et al, 1983). Les femmes ostéoporotiques sont plus petites de taille et ont moins de gras, de muscles et de force tandis que les femmes arthrosiques sont plus grasses, plus grande de taille et elles ont plus de force et de muscles. Des études cliniques ont montré que les maladies les plus communes chez les personnes âgées sont l'ostéoporose et l'arthrose, et que ces deux maladies n'affectent presque jamais la même personne (Christiasen et al, 1981; Cooper et al, 1991; Dequeker et al, 1975; De Sese et al, 1962; T-Ors et al; 1972; Roh et al, 1974; Urist et al, 1960; Vertraeten et al, 1991). En particulier, la fracture de la hanche est rarement observée chez les personnes arthrosiques (Astrom et al, 1992; Pogrund et al, 1982). L'arthrose est de plus un facteur négatif pour la fracture de la hanche (Dequeker et al, 1993a) et pour la fracture de la colonne vertébrale (Healy et al, 1985).

Donc, ces observations semblent montrer que l'ostéoporose et l'arthrose sont deux maladies qui ne sont pas associées. Il est même suggéré que l'arthrose puisse protéger

contre l'ostéoporose. Cette dernière est une maladie reliée à l'augmentation de la résorption osseuse et une diminution de sa formation, donc à la fragilité osseuse. Mais est ce que l'arthrose est une maladie osseuse?

III.5. La pathologie de l'arthrose

L'arthrose induit des grands changements dans l'articulation incluant une dégradation du cartilage, la formation d'ostéophytes, une sclérose de l'os sous-chondral et l'altération de la membrane synoviale (Bullough et al, 1994; Poole et al, 1989) et dont le résultat final est la destruction progressive de l'articulation.

III.5.1. Le cartilage normal

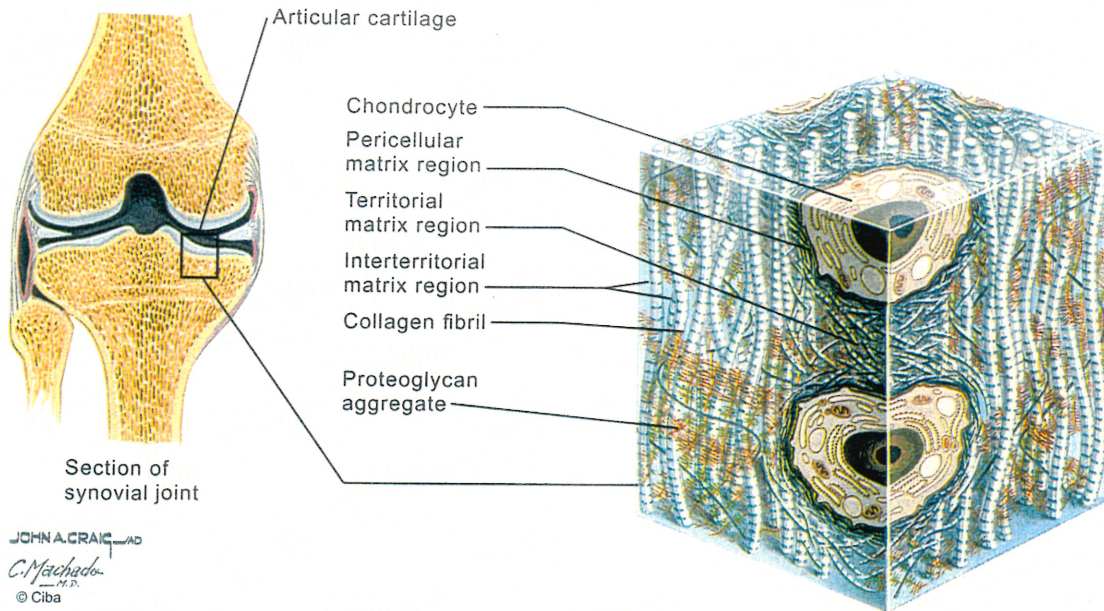
Le cartilage est un tissu conjonctif hautement spécialisé. Il sert, avec le liquide synovial, comme lubrifiant pour l'articulation et il sert aussi pour distribuer le poids appliqué sur l'articulation. Le cartilage ne contient ni vaisseaux sanguins, ni fibres nerveuses, ni vaisseaux lymphatiques. Ce tissu est formé exclusivement d'un type de cellule, les chondrocytes. Les chondrocytes représentent de 2 à 10% du volume du cartilage et sont entourées d'une matrice extracellulaire très importante dont les principales macromolécules sont le collagène et les protéoglycanes (voir figures 1 et 2). Les chondrocytes possèdent un phénotype spécialisé qui contrôle l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des macromolécules de la matrice extracellulaire du cartilage. Le remodelage du tissu conjonctif en général nécessite la dégradation des différentes macromolécules. À cette fin, plusieurs protéases participent, dont la plus importante famille est celle des métalloprotéases qui comprend la collagénase, la stromélysine et la gélatinase. La collagénase est la seule enzyme capable d'initier la dégradation du

collagène natif de type I, II et III. La stromélysine agit de préférence sur les protéoglycanes mais peut dégrader aussi la fibronectine et la laminine. La gélatinase, pour sa part, dégrade le collagène dénaturé, le collagène de type IV et V, la gélatine et la fibronectine.

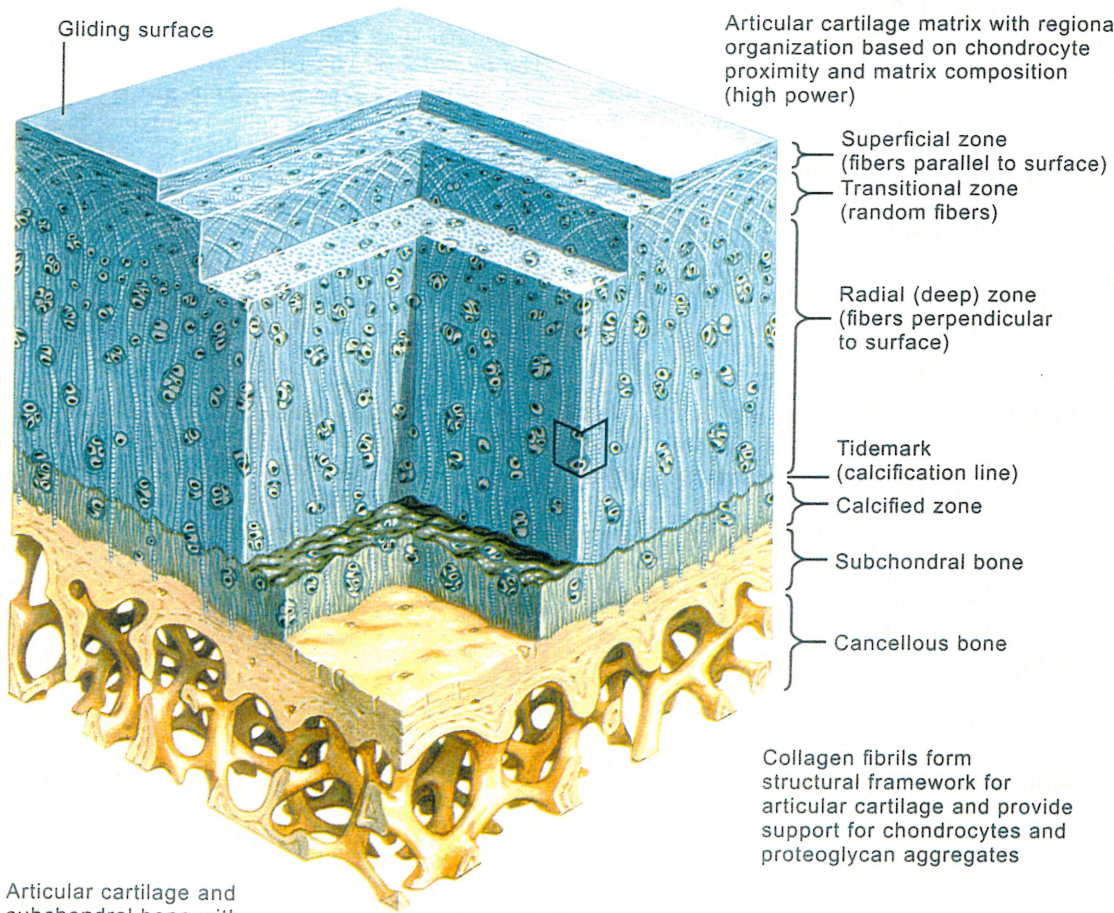
III.5.2. Le cartilage arthrosique

La dégradation du cartilage dans cette maladie est due à un déséquilibre entre la formation et la dégradation des macromolécules de ce tissu. En effet, les travaux de Dean et al (1994) ont montré que la synthèse des métalloprotéinases matricielles (MMP) est augmentée dans le cartilage arthrosique; de plus, les inhibiteurs naturels de ces enzymes, les TIMP (pour Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) ne sont pas synthétisés en quantité suffisante pour inhiber l'excès des MMPs. Les MMPs sont des enzymes activés majoritairement à pH neutre, qui contiennent un zinc dans leurs sites actifs et qui fonctionnent à l'extérieur de la cellule. De plus, elles jouent un rôle majeur dans la dégradation du collagène, des protéoglycanes et autres macromolécules à l'état normal et pathologique (Krane et al, 1994). La stromélysine, qui est aussi une MMP produite par la membrane synoviale inflammée et par les chondrocytes, est élevée dans le liquide synovial des patients arthrosiques (Bonassar et al, 1995). Cet enzyme peut cliver l'aggrécane (agrégat de protéoglycanes) et le collagène de type II, IX, X et XI (la stromélysine ne peut pas dégrader le collagène de la triple hélice mais celui qui est déjà dégradé partiellement par la collagénase). La dégradation du collagène de type II-IX déstabilise le réseau et la structure complexe du collagène, ce qui rend l'aggrécane moins

Structure of Articular Cartilage



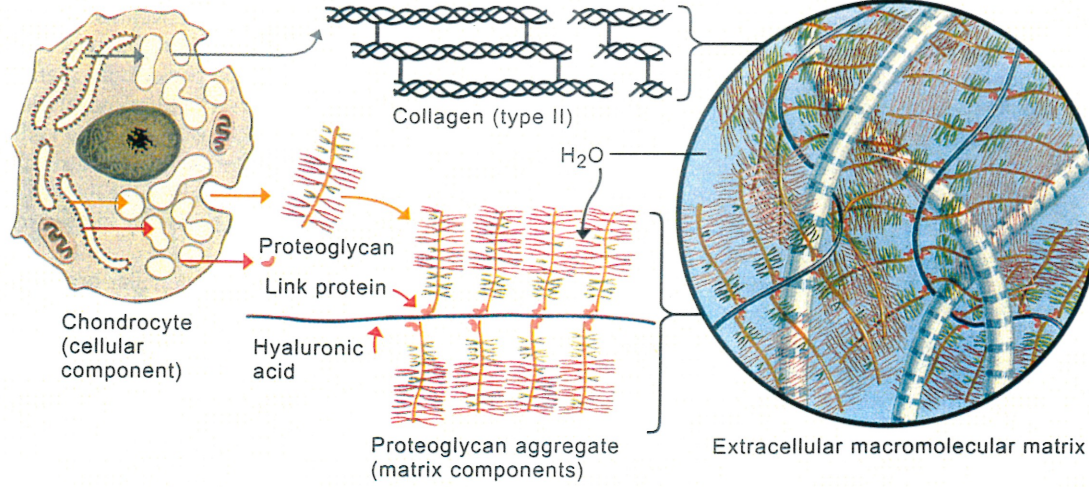
Articular cartilage matrix with regional organization based on chondrocyte proximity and matrix composition (high power)



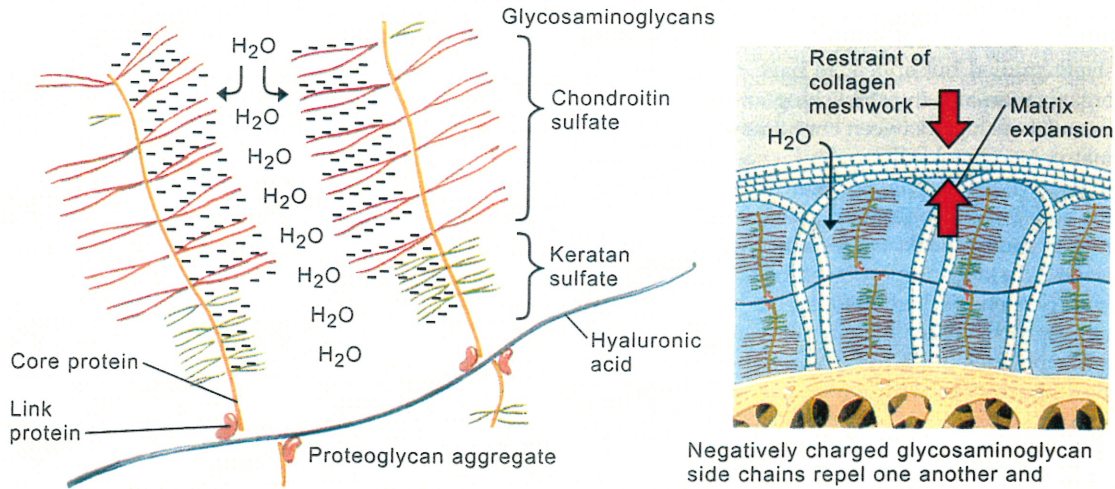
Articular cartilage and subchondral bone with lamellar organization (low power)

Figure 1: la structure du cartilage articulaire

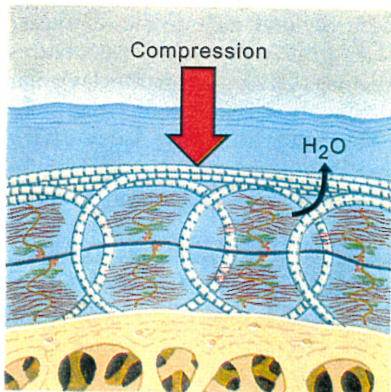
Composition of Articular Cartilage



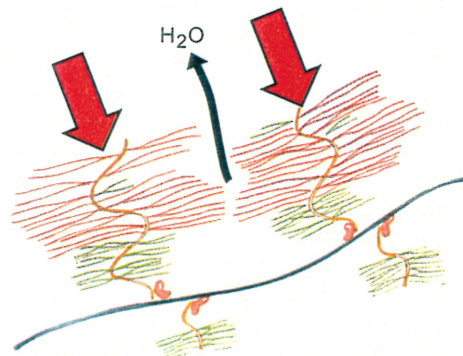
Chondrocytes synthesize collagen (structural framework) and hydrophilic proteoglycans, which interact with collagen fibrils to form hydrated macromolecular matrix of articular cartilage



Negatively charged glycosaminoglycan side chains repel one another and attract water, increasing matrix volume. Expansion limited by collagen meshwork



Compression of matrix pushes glycosaminoglycan side chains together, releasing water and decreasing matrix volume. Decompression allows reexpansion of molecule and matrix volume



JOHN A. CRAIG, MD
C. Machado
© Ciba

Figure 2: la composition du cartilage

apte à résister à la pression osmotique. Ceci entraîne une augmentation hydrique du tissu car il y a moins de molécules d'eau qui s'attachent à l'aggrécane (Bonassar et al, 1995). Le clivage enzymatique du collagène conduit à la fibrillation, l'érosion et à la formation de fissures dans le cartilage. L'aggrécane est aussi une cible probable des MMPs. Les analyses de liquide synovial des patients arthritiques ont montré la présence de fragments d'aggrécane de l'extrémité N-terminale jusqu'à l'Ala 374 (Caterson et al, 1994; Hughes et al, 1994; Ilic et al, 1992; Lohmender et al, 1993; Sandy et al, 1991). L'enzyme responsable de la dégradation de l'aggrécane a été beaucoup étudiée et caractérisée (Vankemmelbeke et al, 1999; Arner et al, 1999; Hughes et al, 1998; Sandy et al, 1998; Arner et al, 1997; Lark et al, 1997), et tout récemment elle a été purifiée et clonée (Tortorella et al, 1999). La dégradation du cartilage et l'enflure du tissu résultent en une altération dans la propriété physique du cartilage incluant la réduction de la compression (Bonassar et al, 1995), de la rigidité tensile (Guilak et al, 1994; Kempson et al, 1979) et de la résistance à la déchirure (Setton et al, 1995).

La réparation du cartilage est caractérisée par une augmentation de synthèse du collagène et du protéoglycane. Le cartilage contient normalement des fibrilles constituées de collagène de type II attaché aux collagènes de type IX et XI via des liaisons croisées. Des liaisons croisées sont aussi présentes entre le collagène de type II et III (Wu et al, 1996). Les processus de réparation du cartilage arthrosique ne réussit pas à garder la balance normale du tissu mature. Les tentatives de réparation se manifestent par une surproduction de certains types de collagène qui existent déjà dans la composition du cartilage et par la synthèse d'autres types de collagène, qui normalement ne se trouvent pas en quantité significative dans le cartilage normal, spécifiquement dans la zone moyenne du cartilage et dans les ostéophytes où le collagène de type II a été retrouvé en

quantité légèrement augmentée et on remarqua aussi dans l'arthrose l'apparition de collagène de type I. De plus, dans les sites de dédifférenciation des chondrocytes, l'apparition de collagène de type III est très remarquable ainsi que de collagène de type X dans la zone profonde (caractéristique des chondrocytes hypertrophiques) (Van Der Mark et al, 1992). Les protéoglycanes aussi produites contiennent un nombre élevé de chaînes de sulfate de kératine et une altération dans l'isomère de sulfate de kératane suggérant que les chondrocytes retournent à un état immature de sécrétion de protéoglycane (Bayliss et al, 1995). Le processus de réparation continue à fonctionner même en phase terminale de la maladie, et ces processus sont caractérisés par une synthèse d'aggrécane immature et foetale qui s'avère inefficace à la réparation du cartilage érodé (Cs-Szabo, 1995). Les mécanismes de réparation du cartilage arthrosique dans le début de la maladie apparaissent ne pas être suffisants à une réparation efficace du tissu endommagé ou dégradé. La raison de cette incapacité est inconnue, mais la possibilité de l'implication de gènes mutés chez les patients arthrosiques n'est pas à écarter.

Les facteurs génétiques impliqués dans l'arthrose furent démontrés pour la première fois en 1940 avec l'observation que les nodules de Heberden (des excroissances osseuses qui se forment aux articulations de l'extrémité des doigts) sont hérités comme des traits autosomaux influencés par le sexe (Moskowitz et al, 1992). L'arthrose peut être considérée comme une interaction de facteurs génétiques (intrinsèque) avec des facteurs environnementaux (extrinsèque). Théoriquement une mutation d'un gène peut affecter la composition biochimique du cartilage conduisant ainsi à une diminution de la durabilité de ce dernier. Ces facteurs génétiques combinés avec des facteurs environnementaux, comme l'occupation, le style de vie et les traumatismes de l'articulation, peuvent être la cause du déclenchement et/ou de la progression de la maladie. En effet, les gènes candidats

susceptibles d'être impliqués dans l'arthrose codent pour des composantes cartilagineuses comme le collagène, le protéoglycane et les protéines liantes. D'autres types de gènes associés à des maladies du squelette peuvent contribuer aussi au développement de l'arthrose. Par exemples, des dysplasies squelettiques sont causées par la mutation du collagène de type II (Vissing et al, 1989), de type IX (Muragaki et al, 1996), de type XI (Vikkula et al, 1995), de la protéine oligomérique matricielle du cartilage (Briggs et al, 1995), du transporteur de sulfate (Hastbaka et al, 1994) et le récepteur 3 du facteur de croissance fibroblastique-1 (Shiang et al, 1994). Ces mutations peuvent contribuer au développement de l'arthrose même si la mutation est seulement partielle. D'autres mutations de gènes qui codent pour des enzymes ou cofacteurs impliqués dans le métabolisme des chondrocytes comme les facteurs qui régulent l'expression des gènes (Horton et al 1993) ou le remodelage osseux (Hart et al, 1994), jouent probablement un rôle très important dans le développement de l'arthrose.

Des expériences sur certains gènes candidats de l'arthrose a donné fruit et permis de déterminer la cause de quelques formes d'arthrose de nature familiale. En effet, la mutation du gène qui code pour le collagène de type II, localisé au chromosome 12 (COL12A1), peut induire une forme d'arthrose (Ala-Koko et al, 1990; Knowlton et al, 1990; Pun et al, 1994 et Vikkula et al, 1993), et aussi d'autres maladies héréditaires rares comme le syndrome de Wagner-Stikler, le syndrome de Goldblatt etc. Chaque mutation dans ce gène peut causer un phénotype différent d'arthrose ou d'autres maladies squelettiques. Par ailleurs, il est maintenant clair que l'arthrose familiale n'est pas attribuable à la mutation unique du gène du collagène de type II et que ce dernier n'est responsable que de 2% de l'arthrose familiale précoce (Loughlin et al, 1994; Priesth et al, 1991; Pun et al, 1994; Ritvaniemi et al, 1995; Williams et al, 1993).

En résumé, la dégradation du cartilage est un des signes les plus évidents et précoce de l'arthrose. Les composantes de ce tissu sont parfois altérées, mais il semble que les tentatives de réparation s'avèrent inefficaces. Un autre signe de l'arthrose est la sclérose de l'os sous-chondral. L'importance de ce tissu osseux dans le déclenchement et/ou la progression de cette maladie reste à être précisée. La sclérose de l'os sous-chondral a été observée depuis longtemps par les médecins mais ce n'est que récemment que les chercheurs se sont intéressés à étudier s'il y aurait des altérations dans le métabolisme de ce tissu.

IV. Le tissu osseux normal

L'os est un tissu conjonctif spécialisé qui, avec le cartilage, forme le squelette. Ce tissu a trois fonctions principales : i) mécanique : c'est le support et le site d'attachement des muscles ii) protection des organes vitaux et la moëlle osseuse; et iii) métabolique, comme un réservoir des ions, spécialement le calcium et le phosphore pour le maintien de l'homéostasie du sérum qui est essentiel à la survie. Contrairement à son apparence rigide et inerte, l'os est un tissu très actif et en remodelage continu. Le tissu de l'os long, qui supporte les articulations, est formé de l'os compact et de l'os spongieux (ou trabéculaire).

IV.1. La structure de l'os normal

IV.1.1. L'os compact

À l'oeil nu, l'os compact paraît très dense, mais le microscope permet de distinguer une multitude de canaux et de passages contenant les nerfs, les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques. L'unité structurale de l'os compact est appelée ostéon, ou

système de Havers. Chaque ostéon a la forme d'un cylindre allongé orienté selon l'axe longitudinal de l'os. Le centre de chaque ostéon forme un canal central (ou canal de Havers), où passent de petits vaisseaux sanguins et des neurofibres qui desservent les cellules de l'ostéon. Des canaux d'autres types sont orientés perpendiculairement à l'axe de l'ostéon; ce sont les canaux perforants de l'os compact (ou les canaux de Volkman) qui permettent les connections nerveuses et vasculaires entre le périoste, les canaux centraux de l'ostéon et le canal médullaire (voir figure 3).

Les ostéocytes sont des cellules osseuses mûres en forme d'araignée, qui se trouvent dans de petits espaces appelés lacunes situées à la jonction des lamelles. Des canaux très fins, les canalicules, relient les lacunes entre elles et avec le canal central de l'ostéon.

Dans cette thèse nous allons utiliser souvent le terme os sous-chondral du genou du tibia. Cet os n'est que l'os cortical qui est adjacent au cartilage du plateau tibial.

IV.1.2. L'os trabéculaire

Contrairement à l'os compact, l'os trabéculaire qui est constitué des travées, semble être un tissu moins structuré et sa construction est plus aléatoire. Toutefois, les travées de l'os sont placées d'une façon très précise afin qu'elles puissent résister aux contraintes et aux chocs. L'os trabéculaire n'est pas formé des ostéons mais d'une couche de quelques cellules.

IV.2. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est une balance entre la formation et la dégradation de la matrice osseuse. Ce phénomène est régulé finement par différentes hormones, facteurs de croissances et cytokines, et est assuré par deux types de cellules, les ostéoblastes

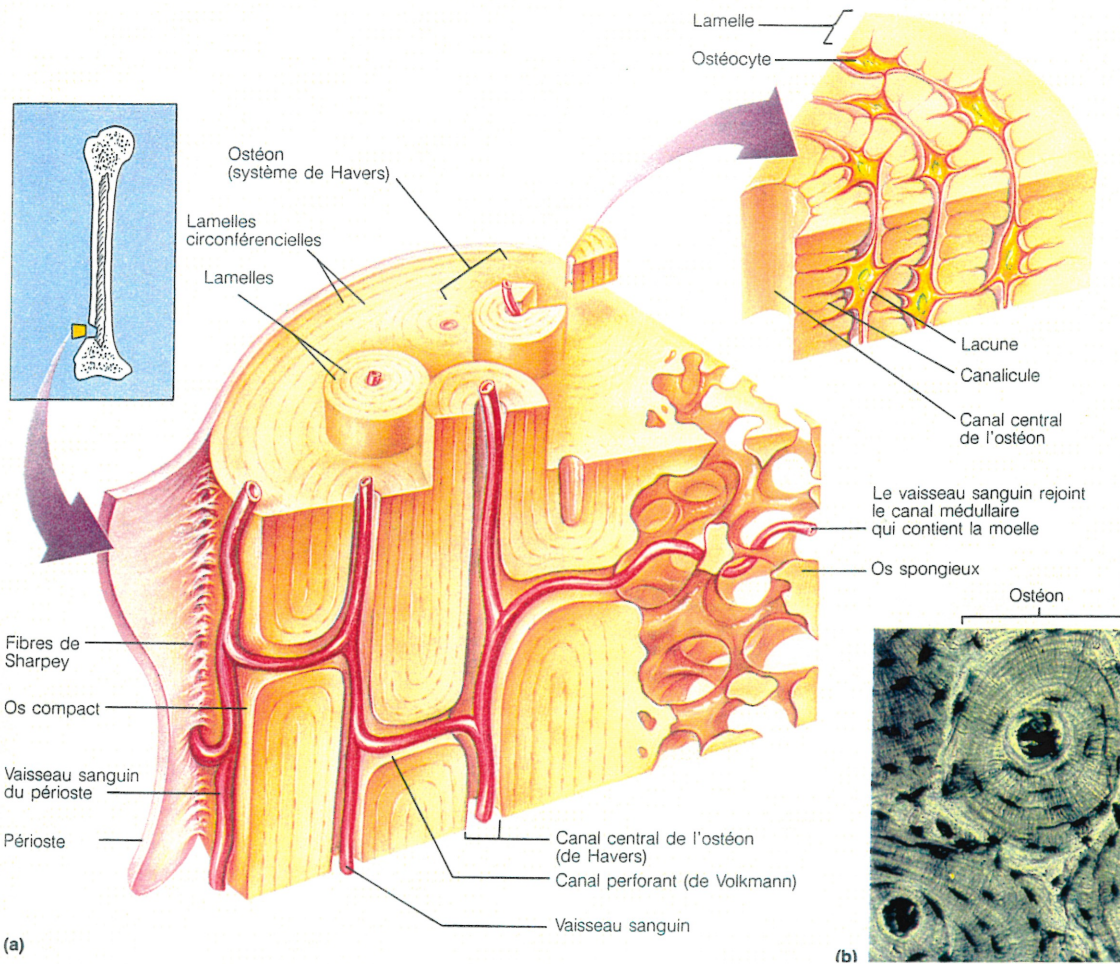


Figure 3: structure microscopique de l'os compact

responsables de la formation de la matrice osseuse et les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse.

IV.2.1. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules osseuses responsables de la production des constituants matriciels. Ils sont originaires des cellules mésenchymateuses locales (des cellules stromales de la moëlle osseuse ou des cellules mésenchymateuses du tissu conjonctif). Ces précurseurs, et suite à une série de stimuli, se différencient et donnent des pré-ostéoblastes qui, à leur tour, se différencient en des ostéoblastes matures. Ces derniers n'apparaissent pas seuls mais en groupe de 100-400 cellules par site de formation. La membrane plasmique de ces cellules est caractérisée par la présence de phosphatase alcaline, qui sert comme marqueur sérique de la formation osseuse.

Les ostéoblastes possèdent des récepteurs pour l'hormone parathyroïdienne (PTH) mais pas pour la calcitonine. Ils possèdent aussi des récepteurs nucléaires pour la vitamine D₃ et pour l'estrogène. Au cours du processus de différenciation des ostéoblastes, ceux-ci déposent une matrice de collagène de plus en plus dense qui va progressivement se minéraliser. À ce stade, les ostéoblastes perdent leur capacité de se diviser et deviennent prisonniers de cette matrice osseuse : ce sont alors des ostéocytes.

IV.2.2. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Ils sont géants et multinucléés (de 4 à 20 noyaux par cellule) et se trouvent en contact avec la matrice osseuse calcifiée dans les lacunes de 'Howship' (lacunes formées par leurs propres activités). De plus ces cellules sont polarisées : i) elles possèdent une membrane en

bordure en brosse située du côté de la matrice osseuse. Cette membrane contient une pompe à proton (H^+ ATPase) qui sécrète les ions d'hydrogène lors de la résorption osseuse; ii) une membrane basolatérale, opposée à la membrane en bordure en brosse, qui est riche en $Na^+ K^+$ -ATPase, en échangeur HCO_3^-/Cl^- et en échangeur Na^+/H^+ . Après avoir formé une zone scellée par l'attachement de l'ostéoclaste sur la matrice osseuse via une zone riche en intégrines, la résorption osseuse commence par la sécrétion des enzymes lysosomiales via la membrane en bordure en brosse vers le compartiment de résorption. Ceux-ci atteignent une concentration élevée parce que ce compartiment est bien scellé grâce à l'attachement étanche de l'ostéoclaste à la matrice osseuse. L'acidification du compartiment extracellulaire est assurée par la sécrétion des protons par la pompe à proton ATPase. Les ions d'hydrogène sont fournis à la pompe par l'anhydrase carbonique. L'activité de la membrane basolatérale est d'échanger du bicarbonate pour un Cl^- évitant ainsi une alcalinisation du cytoplasme.

Le pH acide dissout les cristaux dans la matrice osseuse. Les enzymes lysosomiales, qui sont maintenant à un pH optimal, dégradent le collagène et les protéines. Les résidus de la digestion sont acheminés par transcytose jusqu'à la membrane basolatérale où ils sont relâchés ou bien alors ils peuvent être relâchés lors du détachement de l'ostéoclaste. D'un point de vue physiologique, la résorption osseuse aide au maintien du niveau de calcium et de phosphore inorganique dans le plasma sanguin.

IV.3. La régulation du remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus complexe impliquant plusieurs hormones systémiques et des facteurs locaux. Ces hormones et facteurs affectent les précurseurs des ostéoblastes et des ostéoclastes. Le métabolisme osseux est régulé par des hormones

polypeptidiques, des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes et aussi par des facteurs locaux. Ces facteurs incluent les facteurs de croissances, les cytokines, les prostaglandines et des protéases à sérine.

IV.3.1. L'hormone parathyroïdienne

L'hormone parathyroïdienne (1-84 PTH) est un polypeptide avec un poids moléculaire de 9500 daltons. Elle stimule la résorption osseuse d'une façon indirecte vu que les ostéoclastes n'expriment pas de récepteur à la PTH; par contre les ostéoblastes l'expriment. La PTH a aussi un effet sur la formation osseuse. Elle peut soit stimuler soit inhiber la synthèse du collagène et des composantes de la matrice osseuse (Canalis et al, 1994 et 1989). En effet, un traitement continu avec la PTH inhibe la formation osseuse *in vitro* en réduisant l'expression de l'ARNm du collagène et par la suite sa synthèse. Contrairement à cette observation, un traitement intermittent stimule la formation du collagène et la formation osseuse. Cet effet anabolique peut être expliqué au moins partiellement par la synthèse des facteurs locaux comme le facteur de croissance de type insulinique (IGF-1) et le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) (Canalis et al 1994 et 1989). La stimulation de la synthèse de l'IGF-1 par la PTH est médiée par l'AMPc ou par une substance pouvant mimer son action (McCarthy et al, 1990). De plus, la PTH a un effet mitogénique sur l'os. Les cellules affectées ne sont pas encore connues, mais cet effet ne semble pas médié par l'IGF-1.

L'effet de la PTH *in vivo* est aussi complexe. Lorsqu'elle est administrée aux patients de manière intermittente, un effet anabolique est observé suite à une augmentation de la formation de l'os trabéculaire (Slovik et al, 1986). Par ailleurs, une administration chronique de la PTH (ou une augmentation de sécrétion associée à une

hyperparathyroïdie primaire) augmente le nombre et l'activité des ostéoclastes ce qui conduit à une augmentation de la résorption osseuse, reflétée par une augmentation du calcium sérique (Talmage et al, 1958; Mundy et al, 1987).

L'action de la PTH ne se limite pas à l'os, mais elle agit aussi sur le rein en activant la synthèse de la 25-hydroxyvitamine D 1-hydroxylase, responsable de transformer la vitamine D₃ inactive en 1, 25 (OH)₂ D₃ active (Garabedian et al, 1972). De plus, la PTH qui mobilise le phosphore de l'os vers la circulation sanguine, augmente la phosphaturie en inhibant la réabsorption de phosphore par les tubes proximaux du rein (Gill et al, 1969; Neer et al, 1989; Bringhurst et al, 1989). Cette même hormone augmente la réabsorption du calcium par les tubes distaux du rein afin de maintenir le niveau de calcium sérique (Bringhurst et al, 1989).

IV.3.2. La calcitonine

La calcitonine est un peptide de 32 acides aminés sécrété par les cellules C de la glande thyroïde. Son action principale est d'inhiber l'activité des ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse. Cette hormone est utilisée comme médicament contre les maladies osseuses qui sont caractérisées par une augmentation de la résorption osseuse comme l'ostéoporose, la maladie de Paget et l'hypercalcémie maligne. La sécrétion de la calcitonine est régulée par le rein et le foie. Elle est aussi un marqueur de la tumeur médullaire de la thyroïde (Deftos et al, 1996, 1987 et 1983).

IV.3.3. La vitamine D

La 1, 25 (OH)₂ vitamine D₃, la forme active de la vitamine D₃ (Fraser et al, 1970; Reichel et al, 1989) est une hormone stéroïdienne synthétisée principalement par le rein

(Lambert et al, 1982) et qui a des fonctions similaires à la PTH. À des doses physiologiques, la 1, 25 (OH)₂ vitamine D₃ stimule la résorption osseuse *in vitro* (Raiz et al, 1992) et aussi *in vivo* (Holtrop et al, 1981). Les récepteurs à la 1, 25 (OH)₂ vitamine D₃ se trouvent dans les ostéoblastes et ils sont complètement absents dans les ostéoclastes matures parce que ces derniers ne répondent pas aux traitements par cette vitamine (Chambers et al, 1982; Merke et al, 1986).

La stimulation de l'activité des ostéoclastes par la 1, 25 (OH)₂ vitamine D₃ pourrait donc se réaliser directement sur les précurseurs des ostéoclastes (qui expriment à ce stade le récepteur à la 1, 25 (OH)₂ vitamine D₃) ou indirectement sur les ostéoclastes matures probablement via un messenger chimique synthétisé par les ostéoblastes (Narbeits et al, 1983).

La 1, 25 (OH)₂ vitamine D₃ joue un rôle très important dans la formation ostéoblastique et dans la minéralisation osseuse. Elle stimule la synthèse de la phosphatase alcaline, du collagène de type I (Beresford et al, 1986), de l'ostéocalcine (Prince et al, 1980), des protéines matricielles contenant des résidues d'acide carboxyglutamique 'Gla matrix protein' (Fraser et al, 1988), d'ostéonectine (Theibaud et al, 1989) et d'ostéopontine (Jin et al, 1989). Ensuite, elle règle à la baisse la réponse des ostéoblastes à la PTH (Titus et al, 1988) et réduit la synthèse des prostaglandines par les ostéoblastes (MacDonald et, 1984).

IV.3.4. Les facteurs de croissance de type insulinique

Les IGFs 'Insulin-Like Growth Factors' sont des polypeptides qui ont un poids moléculaire de 7600 daltons (Jones et al, 1995). Deux IGFs sont identifiés et caractérisés, il s'agit de l'IGF-1 et l'IGF-II. Ces deux facteurs de croissance sont présents dans la

circulation sanguine et sont synthétisés par plusieurs tissus dont l'os où ils agissent comme régulateurs du métabolisme cellulaire, surtout pour les ostéoblastes. L'IGF-1 qui se trouve dans la circulation est synthétisé par le foie. Cette synthèse est régulée par l'hormone de croissance tandis que la synthèse périphérique est régulée par plusieurs hormones (Delnay et al, 1994; Jones et al, 1995). Dans la circulation sanguine, les IGFs sont liés à des protéines liantes nommées IGFbps pour 'Insulin-Like Growth Factor Binding Protein' (Jones et al, 1995). Ces protéines liantes sont synthétisées et sécrétées par les mêmes cellules qui synthétisent et sécrètent les IGFs.

Les effets biologiques des IGF-1 et IGF-II sont similaires. Dans l'os, l'IGF-1 est 4 à 7 fois plus puissant que l'IGF-II (MacCarthy et al, 1989), mais ce dernier est présent à des concentrations beaucoup plus élevées que l'IGF-1 (McCarthy et al, 1989). Les IGFs systémiques peuvent agir sur le tissu osseux mais les IGFs locaux (synthétisés par l'os) ont un effet direct et beaucoup plus efficace. En effet, l'IGF-1 augmente la synthèse du collagène et stimule la replication des ostéoblastes (Hock et al, 1988). L'effet de l'IGF-1 sur la synthèse de la matrice osseuse dépend en partie de son effet prolifératif sur les ostéoblastes mais aussi sur sa capacité de moduler le fonctionnement de ces cellules. Il augmente la synthèse du collagène de type I et diminue la transcription de la collagénase-3 responsable de la dégradation de l'os avec la collagénase-1 (Canalis et, 1995). Cet effet double, l'augmentation de la synthèse du collagène et la diminution de sa dégradation conserve la matrice et la masse osseuse. En effet, l'injection d'IGF-1 à court terme aux humains cause un effet anabolique généralisé et augmente le remodelage osseux (Ebeling et al, 1993).

L'effet des IGFs peut être modulé soit par leur synthèse, soit par leur liaison aux récepteurs ou en modulant les protéines liantes. La synthèse de l'IGF-1 est modulée par

des hormones et par des facteurs de croissances tandis que la synthèse de l'IGF-II est régulée généralement par des facteurs de croissance (Gabbitas et al, 1994; Canalis et al, 1993). La PTH et d'autres agents qui stimulent l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) dans les cellules osseuses, comme la prostaglandine E2 (PGE2) sont les principaux stimulateurs de l'IGF-1 (McCarthy et al, 1990). Au contraire, l'hormone de croissance a un effet plus modeste sur la synthèse de l'IGF-1 par l'os tandis que les glucocorticoïdes l'inhibent complètement (McCarthy et al, 1990). Les autres facteurs de croissance synthétisés par l'os et qui possèdent une propriété mitogénique comme le TGF- β , le 'Fibroblast Growth Factor' (FGF), et le 'Platelet-Derived Growth Factor' (PDGF) inhibent la synthèse des IGFs par les ostéoblastes (Gabbis et al, 1994; Canalis et, 1993). Les cellules osseuses peuvent aussi synthétiser et sécréter les protéines liantes. Jusqu'à maintenant, six sont connues et nommées IGFBP-1 à 6. Bien que le rôle précis de chacune de ces protéines liantes n'est pas bien connu, elles peuvent augmenter la demi-vie des IGFs, neutraliser ou inhiber leurs effets biologiques ou être impliquées dans le transport des IGFs jusqu'à la cellule cible. Quelques protéines liantes, comme l'IGFBP-4, a un effet inhibiteur pour les IGF-1. Par ailleurs l'IGFBP-5 stimule la prolifération des cellules osseuses et augmente l'effet de l'IGF-1 (Delany et al, 1994). La régulation de la synthèse des IGFBPs dans les cellules osseuses est très complexe. En effet, les IGFBP-3, 4, et 5 sont sous le contrôle de l'AMPc tandis que les autres IGFBPs sont contrôlées par l'IGF-1 et l'IGF-II. La PTH et la 1, 25 (OH)₂ D₃ augmentent la synthèse de l'IGFBP-4 (La Tour et al, 1990; Scharla et al, 1992). Les IGF-1 et II stimulent la synthèse de l'IGFBP-5 (Lempert et al 1991).

IV.3.5. L'activateur du plasminogène

Les activateurs du plasminogène, dans leurs deux formes l'uPA (urokinase) et le tPA (tissu), sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques. Ils interviennent non seulement dans la fibrinolyse mais aussi dans la migration cellulaire, l'ovulation, l'invasion tumorale, l'inflammation et le remodelage tissulaire (Vassalli et al, 1991; Pollanen et al, 1991; Blasi et al, 1993; Dano et al, 1985; Mullis et al, 1983 et Saksela et al, 1985) et certaines processus pathologiques.

Sécrété sous forme simple chaîne, l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et du type tissulaire (tPA) sont deux protéases à sérine qui se convertissent en une molécule active de deux chaînes par plusieurs protéases dont la plasmine qui est également une protéase à sérine. La conversion de l'uPA simple chaîne en uPA actif requiert l'hydrolyse d'un lien peptidique entre la Lys (158)-Ile (159) par la plasmine (Kasai et al, 1985).

L'uPA est la forme la plus sécrétée dans le liquide interstitiel et dans l'urine. Elle est formée de deux chaînes polypeptidiques liées par un pont disulfure (Schneider et al, 1982; Bachmann et al, 1987). La chaîne catalytique B est une protéase à sérine avec un poids moléculaire de 33 k daltons; la chaîne A à un poids moléculaire de 18 k daltons. Cet activateur de plasminogène est un agent thrombolytique utilisé dans le traitement de plusieurs maladies dont l'embolie pulmonaire (Sasahara et al, 1967), l'insuffisance cardiaque (Mathey et al, 1987; Neuhaus et al, 1988) et d'autres maladies thrombolytiques (Marder et al, 1988).

La structure de l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA) ressemble beaucoup à celle de l'uPA (Strasberg et al, 1983). Il est sécrété sous forme d'une simple chaîne inactive

avec un poids moléculaire de 70 kD (Wallen et al, 1983) sur gel de polyacrylamide. La molécule est glycosylée sur 3 des 4 sites potentiels de glycosylation (Pohl et al, 1984). La digestion du tPA inactif par la plasmine génère le tPA actif à deux chaînes polypeptidiques A et B, liées par un pont disulfure. La chaîne A contient une région homologue à l'EGF (Pennica et al, 1983), et cette même région est présente aussi dans la chaîne A de l'uPA (Gunzler et al, 1982). Le segment C-terminal de la chaîne B contient le site actif de la molécule qui est homologue à d'autres sites actifs des protéases à sérine (Pennica et al, 1983). Le tPA a une faible activité sur le plasminogène, mais l'ajout de fibrine peut augmenter beaucoup la formation de la plasmine à partir du plasminogène (Ranby et al, 1982) par le tPA.

Les fonctions physiologiques du tPA incluent la fibrinolyse, l'ovulation, la spermatogénèse, le développement embryonnaire, la dégradation du tissu mammaire après l'allaitement, l'activation des kératinocytes et finalement l'activation de proenzymes en enzymes actives (Saksela, 1985 revue).

IV.3.5.1. La régulation du système PA/plasmine dans l'os

Les agents impliqués dans la résorption osseuse, comme la PTH et la PGE₂, augmentent l'activité de l'uPA dans les cellules osseuses normales et transformées de rat via la voie de l'AMPc (Allan et al, 1986; Hamilton et al, 1984 et 1985). Hoekman et al (1991) ont montré que la PTH augmente l'activité de l'uPA et du tPA dans les cellules normales et transformées de rat et ceci en mesurant l'hydrolyse d'un substrat spécifique pour l'activateur du plasminogène. En effet la PTH module l'activité de l'uPA et du tPA en diminuant l'ARNm de leur protéine inhibitrice, la PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1) (Fukumoto et al, 1992; Whohlwend et al, 1993).

De plus, le dexaméthasone (un glucocorticoïde), le corticostérone et l'hydroxycortisone suppriment l'activité basale de l'uPA ainsi que l'activité stimulée par la 1, 25 (OH)₂ D₃ dans les ostéoblastes normaux et transformés (Hamilton et al, 1984 et 1985) tandis que l'estradiol et la progestérone sont inefficaces. Les résultats par analyse Northern ont montré que le dexaméthasone augmente l'ARNm du PAI-1 sans modifier ceux du tPA et de l'uPA (Fukomoto et al, 1992). D'autre part, la 1, 25 (OH)₂ D₃ augmente l'activité de l'uPA en diminuant l'ARNm du PAI-1 et en modifiant légèrement les messagers du tPA et de l'uPA (Fukomoto et al, 1992).

Finalement des cytokines peuvent aussi moduler l'activité de l'uPA. Le TGF- β inhibe l'activité de l'uPA en stimulant l'ARNm du PAI-1 dans les cellules normales et transformées (Allan et al, 1991; Pfeilschiffer et al, 1990). Des résultats surprenants ont montré que le messager de l'uPA est augmenté aussi après stimulation avec le TGF- β mais cette cytokine n'a aucun effet sur l'ARNm du tPA. D'autres cytokines et facteurs de croissance comme le PDGF et l'EGF acide et basique stimulent l'activité de l'uPA (Cheng et al, 1991; Laschinger et al, 1991; Pfeilschifter et al, 1992), tandis que les effets rapportés des IL-1 α et β et le TNF- α sont contradictoires. Elles peuvent soit augmenter l'activité de l'uPA ou n'ont aucun effet sur cette protéase (Evans et al, 1990; Fawthrop et al, 1992; Hoekman et al, 1991; Laschinger et al, 1991)

IV.3.5.2. Le rôle potentiel de l'uPA dans l'os

Les collagénases et ses inhibiteurs (TIMPs) sont connus dans leur implication dans le remodelage osseux (Eeckhout et al, 1977). Ils sont synthétisés et sécrétés par les ostéoblastes et régulés par les hormones qui contrôlent la résorption osseuse (Health et al, 1984; Partridge et al, 1987; Thomson et al, 1989). La collagénase-1 est sécrétée sous

forme inactive (procollagénase) et elle est activée par plusieurs protéases dont la plasmine. Il a été suggéré que le système uPA /Plasmine jouerait un rôle très important dans la résorption osseuse (Hamilton et al, 1985) et ceci en activant la procollagénase-1 en collagénase active. À son tour, la collagénase dégrade le collagène et rend l'os vulnérable à la résorption par les ostéoclastes (Chambers et al, 1985 et 19985 b).

L'activation des facteurs de croissance par la plasmine montre un rôle crucial du système PA/Plasmine dans la formation osseuse. En effet, le TGF- β latent est activé, en partie, par la plasmine en TGF- β actif, phénomène démontré dans plusieurs types cellulaires incluant les ostéoblastes (Allan et al, 1991; Flaumenhaft et al, 1992; Lyons et al, 1991; Sato et al, 1990). De plus, lors de la réparation d'une fracture, la PTH et le plasminogène travaillent conjointement à augmenter la migration des ostéoblastes, chez les souris néonatales, vers le site dénudé. Cette migration est inhibée en ajoutant un anticorps contre le TGF- β . Seul, aucun de ces trois agents n'a un effet sur la migration des ostéoblastes (Fukumoto et al, 1992). Cette observation combinée avec le fait que la PTH diminue l'ARNm du PAI-1 (inhibiteur du plasminogène), montre que le système PA/plasmine joue un rôle, non seulement dans la résorption osseuse, mais aussi dans son remodelage. De plus, l'IGF-1, une autre cible pour la plasmine, dissocie ce facteur de croissance de sa (ses) protéine(s) liante(s) permettant ainsi à l'IGF-1 d'exercer ses fonctions biologiques (Campbell et al, 1992).

Plusieurs études ont suggéré un rôle mitogénique de l'uPA. En effet, Rabbani et al (1991) ont montré que le fragment amino-terminal de l'uPA stimule la prolifération des ostéoblastes dans des lignées ostéoblastiques et dans les ostéoblastes de rat en culture primaire. Cette même observation a été démontrée dans d'autres modèles (Fibbi et al, 1988; Gudewics et al, 1987). Des études plus récentes ont montré que le fragment amino-

terminal seul peut augmenter la prolifération des ostéoblastes humains et que le site actif de l'uPA n'a aucun rôle dans ce phénomène (Estreicher et al, 1989; Rabbani et al, 1992).

IV.4. L'os arthrosique

IV.4.1. L'os sous-chondral arthrosique

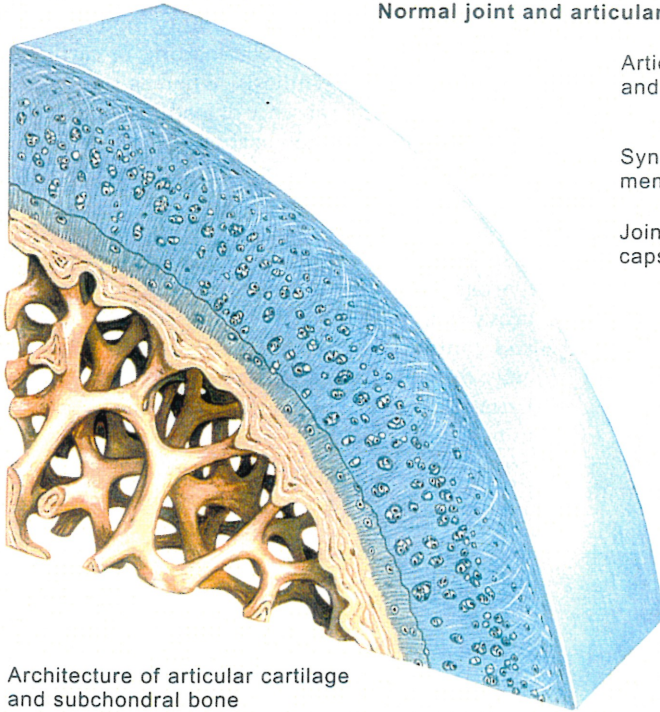
Jusqu'à 1996, seulement deux équipes se sont penchées sur le métabolisme de l'os arthrosique. Depuis, une grande explosion a eu lieu. Présentement, il y a plus de dix équipes qui travaillent sur le métabolisme de l'os arthrosique et leurs résultats seront cités et discutés dans la section discussion de cette thèse.

Le changement de l'os sous-chondral dans l'arthrose peut être dû soit à un changement local comme l'effet du poids sur les articulations, soit à une maladie généralisée de l'os comme la maladie de Paget. Dans leurs travaux, Simon et al (1992) induisaient la dégradation du cartilage chez le lapin en appliquant des charges excessives et répétitives sur l'articulation. Les changements débutaient tout d'abord au niveau de l'os sous-chondral suivi par une dégradation du cartilage. De plus, Radin et al (1970) ont montré que l'application de charges excessives sur l'articulation causait un épaissement de l'os sous-chondral dû à la réparation des microfractures. L'os devient plus épais et moins souple, donc moins absorbant pour les chocs. Le cartilage absorbera alors la pression transférée par l'os, ce qui peut entraîner sa dégradation.

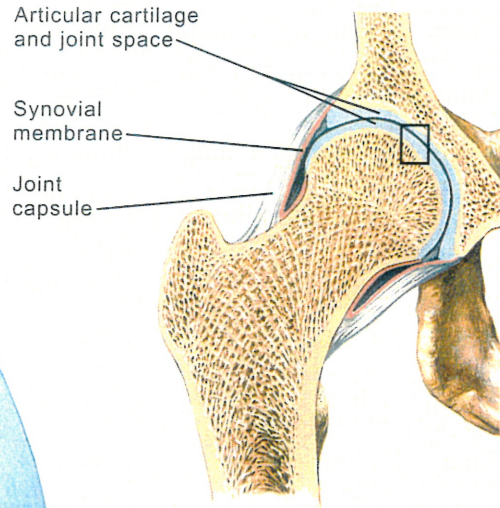
L'apparence morphologique de l'os arthrosique est bien connu et documenté. L'os sous-chondral subit plusieurs changements (Amir et al, 1992). La sclérose commence dans les zones où le cartilage est dégradé surtout dans la surface portante du plateau tibial interne et dans la partie centrale de la tête fémorale. La production d'ostéophytes commence sur la circonférence de l'articulation, et ils sont nommés aussi des cystes. Ces ostéophytes

Joint and Articular Changes

Normal joint and articular surface



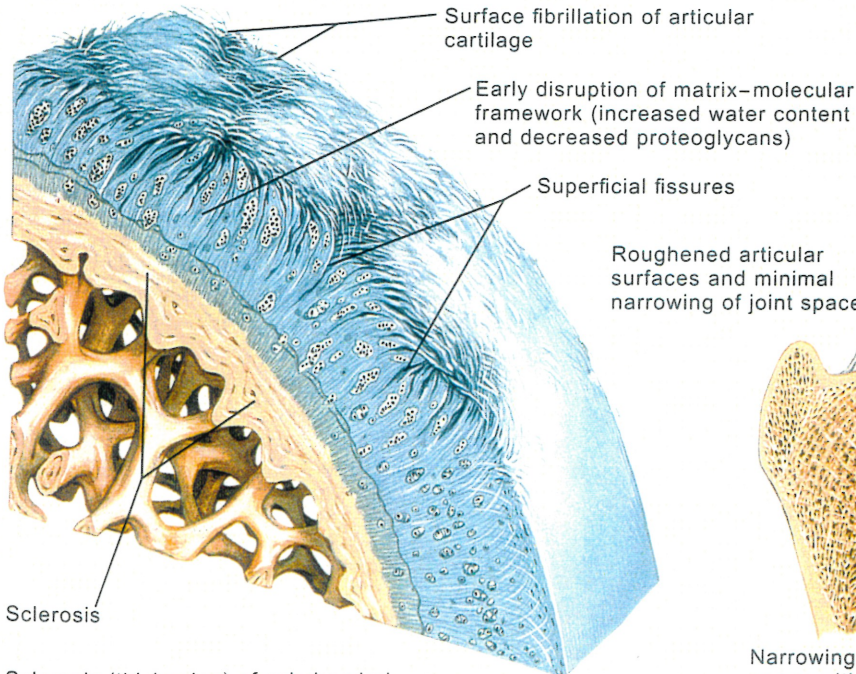
Architecture of articular cartilage and subchondral bone



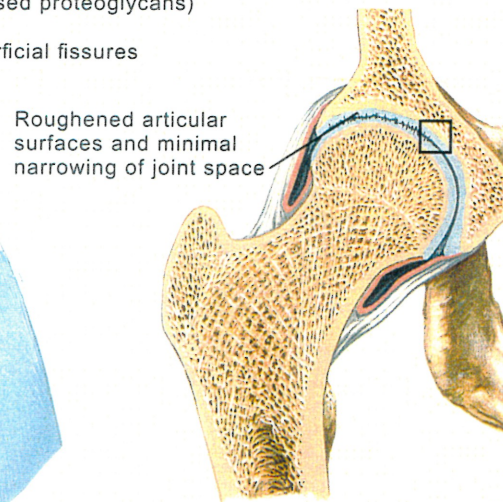
Joint with normal space and cartilage-covered articular surfaces

JOHN A. CRAIG, M.D.
C. Machado, M.D.
© Ciba

Early degenerative changes



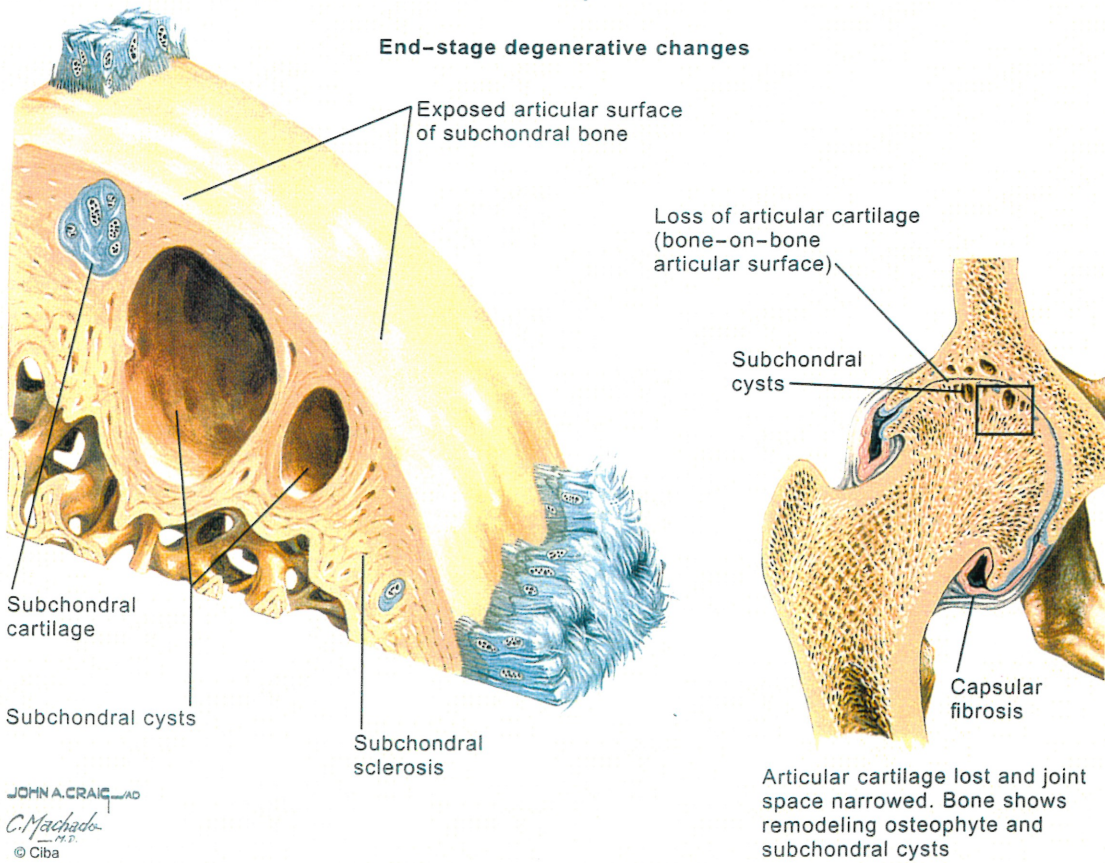
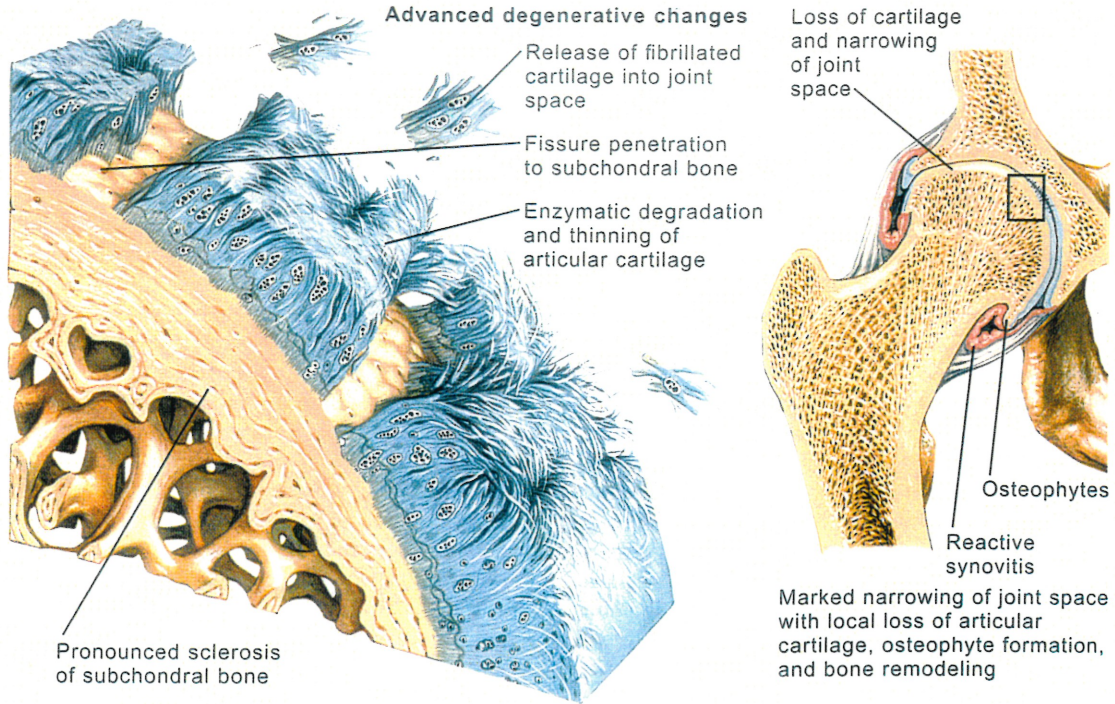
Sclerosis (thickening) of subchondral bone early sign of degeneration



Narrowing of upper portion of joint space with early degeneration of articular cartilage

Figure 4: les modifications morphologiques de l'os et du cartilage lors de l'arthrose

Joint and Articular Changes (continued)



JOHN A. CRAIG, M.D.
C. Machado
 © Ciba

Figure 5: les modifications morphologiques de l'os et du cartilage lors de l'arthrose (suite)

contiennent des fibrovasculaires, du cartilage et sont enveloppés par une couche osseuse montrant une nouvelle formation osseuse active (voir figures 4 et 5).

Donc, les changements morphologiques au niveau de l'os sous-chondral sont très importants et il sera très intéressant d'examiner de près l'os sous-chondral arthrosique et d'étudier ses modifications morphologiques et biochimiques.

IV.4.1.1. L'os sous-chondral dans l'arthrose du genou

L'os sous-chondral du tibia dans l'arthrose a été étudié histologiquement et par microradiographie par Havdrup et al (1976). Cette équipe a démontré que la 'tidemark' (la couche qui sépare le cartilage minéralisé de l'os) est doublée et parfois triplée dans l'arthrose tel que décrit aussi par Green et al (1970). Cette couche est irrégulière et il y a aussi des prolongements de chaque tissu dans le tissu avoisinant (Stougard et al, 1974). L'os sous-chondral a une forte tendance à se scléroser sous forme d'un épaissement de l'os cortical et une confluence des trabécules pour former un bloc massif d'os. Quand l'os devient complètement dénudé, il y a formation d'une couche fine d'os contenant des ostéocytes nécrosés. La sévérité de la sclérose de l'os sous-chondral varie avec le degré d'érosion du cartilage.

Lorsque le cartilage est relativement intact, l'os sous-chondral arthrosique ressemble beaucoup à l'os normal; par contre plus le cartilage est mince, plus l'os sous-chondral est épais. Cette sclérose est focalisée et varie en profondeur de 500 à 3000 μm (Todd et al, 1972). Dans la zone sclérosée, l'os sous-chondral apparaît très dur et minéralisé avec des signes d'augmentation du remodelage. Les trabécules sont plus larges et les sites de résorption contiennent beaucoup plus de cellules. Entre les trabécules, les cellules de la moëlle osseuse sont rares, les cavités sont fibrillées et pauvres en cellules. Il arrive très

souvent de voir des microfractures dans l'os sous-chondral sclérosé, ces microfractures s'allongeant du cartilage calcifié jusqu'à l'os trabéculaire en passant par l'os cortical.

Les ostéoblastes dans les trabécules sclérosés semblent moins actifs que les ostéoblastes normaux; ils sont en état de repos 'resting cells'. Seuls les ostéoblastes dans les cavités de résorption sont très actifs (Dequeker et al, 1987). Le volume ostéoïde du tissu est relativement normal au départ mais augmente avec la sévérité de la maladie, et se retrouve localisé à l'entour des cavités de résorption. Puug et al (1974) ont montré que l'os trabéculaire dans les condyles fémoraux arthrosiques change de profil géométrique à un stade précoce de l'arthrose dégénératif. Ce changement d'arrangement spatial de l'os trabéculaire est en parfaite corrélation avec la sclérose de l'os sous-chondral et la perte du cartilage, suggérant que le changement osseux n'est pas secondaire mais contribue au déclenchement et à la progression de cette maladie.

IV.4.2. L'arthrose chez les modèles expérimentaux

L'os sous-chondral a été peu étudié chez les modèles animaux arthrosiques. Layton et al (1988) ont utilisé un microscope axial tomographique relié à un ordinateur pour évaluer la structure de l'os sous-chondral de la tête de fémur chez les cochons d'Inde qui développent l'arthrose spontanément. Leurs résultats ont montré que les changements dans l'os trabéculaire profond surviennent au début de cette maladie. Ces changements surviennent quand le cartilage est légèrement dégradé. De plus ces changements sont accompagnés d'un épaissement des trabécules. Cette observation supporte l'idée que le changement osseux est un événement précoce dans l'arthrose.

De plus, Dedrick et al (1993) ont évalué la séquence des changements articulaires du cartilage, de l'os trabéculaire et de l'os sous-chondral cortical chez un modèle canin

arthrosique 3 mois, 18 mois et 54 mois suivant la résection du ligament croisé antérieur. Les spécimens de plateaux tibiaux médiaux (ou interne) analysés avec un microscope tomographique relié à un ordinateur (micro-CT) avec une résolution de 60 μm ont montré à 3 et 18 mois post-opératoire une petite ulcération du cartilage du genou instable et une augmentation de la proportion d'eau dans le liquide synovial, deux changements typiques d'un début d'arthrose. À 54 mois le cartilage était complètement érodé. Les analyses microscopiques montraient une perte de l'os trabéculaire dans le genou instable comparativement au genou contra-latéral. D'autre part, l'os sous-chondral du plateau tibial latéral est devenu plus épais après 18 et 54 mois mais la différence n'était pas significative. Ces mêmes auteurs ont conclu que la sclérose de l'os sous-chondral n'est pas nécessaire pour la dégradation du cartilage dans le modèle d'arthrose canine. Ces auteurs ont de plus suggéré que les changements dans l'os sous-chondral ne sont probablement qu'un effet secondaire au changement et à la dégradation du cartilage. Toutefois, la résection du ligament croisé antérieur suivi par une dégradation du cartilage ne reflète pas nécessairement la maladie arthrosique chez l'humain. Par contre ce modèle reflète la dégradation du cartilage. La cause de l'arthrose n'est pas connue et n'est pas nécessairement due seulement à l'instabilité de l'articulation mais aussi à d'autres facteurs qui apparaissent multiples.

IV.4.3. La composition biochimique de l'os arthrosique

Les changements dans l'os arthrosique ne sont pas seulement morphologiques mais aussi biochimiques. En effet, l'os de la crête iliaque montre moins de glycoprotéines et de protéoglycanes chez les patients arthrosiques comparativement à l'os d'individus normaux (Gevers et Dequeker, 1987). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que

l'ostéocalcine sérique est significativement plus élevée chez les personnes atteintes d'arthrose de la main que chez les personnes normales. Cette même équipe a montré que les concentrations de l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), IGF-II et le TGF- β (transforming Growth Factor- β) sont augmentées dans la matrice osseuse de la crête iliaque arthrosique (Dequeker et al, 1993). Ces facteurs de croissance sont produits localement et sont résistants au milieu acide, ce qui leur permet d'être actifs et fonctionnels durant la résorption osseuse et d'agir sur les progéniteurs des ostéoblastes et des ostéoblastes d'une façon paracrine et autocrine (Mohan et al, 1986). Il a été suggéré que l'IGF-1 et le TGF- β peuvent faire le lien entre la formation et la résorption de l'os (Baylink et al, 1990; Canalis et al, 1988; Farby et al, 1987). Plusieurs propriétés biologiques ont été attribuées à l'IGF-1 et au TGF- β , et ils ont d'ailleurs un effet métabolique sur les cellules osseuses. De plus ils sont synthétisés et sécrétés en grande quantité dans la matrice osseuse. Ils sont aussi activés et relâchés de la matrice lors de la résorption osseuse. Cette concentration élevée d'IGF-1 et de TGF- β pourrait expliquer l'augmentation de la masse osseuse chez les patients arthrosiques.

IV.4.4. L'arthrose : une maladie primaire de l'os !?!

Jusqu'à présent, les évidences expérimentales suggèrent que l'arthrose est initialement une maladie primaire osseuse et que la dégradation du cartilage n'est qu'une résultante du changement morphologique et biologique de l'os. En effet, les patients arthrosiques possèdent une masse osseuse préservée comparativement à d'autres individus du même âge (Carlsson et al, 1979; Foss et al, 1972; Hannan et al, 1974), indépendamment du poids corporel (Belmonte-Serrano et al, 1993; Gotfriedsen et al, 1990; Hart et al, 1994; Hordon et al, 1993; Lame and Nevitt, 1994; Mokassa et al, 1993; Nevitt et al, 1992;

Vandermeersch et al, 1990). Cette différence ne peut s'expliquer par le dosage des hormones calcitropiques sériques qui n'a révélé aucune différence significative des niveaux de la PTH, de la 25(OH) et de la 1,25 (OH)₂ vitamine D₃ entre les personnes arthrosiques et des individus normaux (Geusens et al, 1983). Par contre, le niveau de l'hormone de croissance est plus élevée chez les patients arthrosiques après stimulation par hypoglycémie (Dequeker et al, 1982). De plus les taux d'ostéocalcine sécrétée par les ostéoblastes après un traitement à la 1,25 (OH)₂ vitamine D₃ *in vitro* ne révèlent aucune différence significative entre les patients atteints d'arthrose et d'ostéoporose, ni entre les patients atteints d'arthrose et des individus jeunes, suggérant que les ostéoblastes restent stimulables dans les deux conditions (Geusens et al. 1991). Le facteur de croissance IGF-1 est élevé chez les patients souffrant d'acromégalie, une maladie associée avec le développement d'une arthrose secondaire (Bluestone et al, 1972). La formation de nouvel os est aussi associée à une élévation d'IGF-1 sérique chez les patients atteints d'une hyperostose squelettique diffuse idiopathique (Cittlejohu et al, 1986). La même observation était rapportée par Schouten et al (1993) montrant que le niveau d'IGF-1 sérique était directement lié à la formation des ostéophytes chez les individus arthrosiques, mais d'autres résultats contradictoires ont aussi été obtenus (Denko et al, 1990; Hochberg et al, 1994; McAlindon et al, 1992). En effet, Hochberg et al (1994) ont examiné la relation entre le taux d'IGF-1 sérique et la sévérité de l'arthrose du genou chez les personnes participant à l'étude 'Baltimore Longitudinal Study of Aging'. La concentration sérique moyenne de ce facteur de croissance était diminuée chez les personnes avec l'arthrose du genou, mais après l'ajustement des résultats en fonction de l'âge, cette différence n'est plus significative. De plus le niveau d'IGF-1 sérique chez les individus arthrosiques n'est pas différent de celui chez les patients ostéoporotiques,

même après stimulation avec le facteur relâchant de l'hormone de croissance 'Growth hormone releasing factor' (Dequeker et al, 1994). Cette dernière équipe a étudié aussi le niveau d'ostéocalcine, comme marqueur du remodelage osseux et de la minéralisation osseuse, chez les personnes atteintes d'arthrose de la colonne vertébrale et du radius, et aussi chez les personnes ostéoporosiques. Cette étude n'a pas relevé une différence significative entre ces paramètres dans l'arthrose et l'ostéoporose (Geners et al, 1988).

Dans une étude de 19 cas où l'arthrose de la colonne vertébrale et l'ostéoporose coexistent, l'équipe de Verstraeten et al (1991) a trouvé des différences entre ces individus et d'autres individus arthrosiques. Ces 19 personnes étaient plus vieilles, avaient plus d'années post-ménopause, de très petites tailles, de faibles poids corporels et une concentration sérique élevée de la PTH. De plus, elles avaient moins d'arthrose de la hanche que d'autres personnes arthrosiques pour une population du même âge, et moins de fragilité osseuse et de fractures comparativement aux autres individus ostéoporotiques. Ces résultats suggèrent que l'arthrose peut avoir un effet protecteur ou un effet retard sur le développement de l'ostéoporose.

En conclusion, les différences observées dans la masse et le métabolisme osseux entre l'arthrose et l'ostéoporose suggère que la pathophysiologie de l'arthrose peut être due à un changement de l'os avec une dégradation secondaire du cartilage. L'augmentation de la masse osseuse et le changement biochimique dans l'arthrose peut ainsi réduire l'absorption des chocs par l'os sous-chondral causant des microfractures dans ce dernier et une dégradation subséquante du cartilage (Dequeker et al, 1975; Porgrund et al, 1982; Weintraub et al, 1982). De plus, ces observations viennent confirmer une ancienne hypothèse de Radin et al (1970) qui avaient suggéré que l'arthrose ne commence pas dans le cartilage mais plutôt au niveau de l'os sous-chondral.

V. Hypothèse de recherche

Connue depuis plusieurs milliers d'années, l'arthrose est une maladie très bien décrite mais dont les causes demeurent toujours incomprises. Son traitement, limité à calmer les douleurs chez le patient atteint et/ou au remplacement du genou dans la gonarthrose, ne pourra se préciser que lorsque la cause principale sera trouvée.

Les personnes atteintes de cette maladie ont un cartilage dégradé et présentent une sclérose de l'os sous-chondral. De nombreux travaux se sont déjà effectués avec, comme hypothèse de départ, que la dégradation du cartilage, observation clinique essentielle de l'arthrose, repose sur une anomalie du cartilage lui-même et des chondrocytes responsables de l'élaboration de la matrice du cartilage articulaire. Malgré cela, l'agent responsable demeure toujours inconnu. Des travaux récents suggèrent aussi que l'os sous-chondral serait altéré dans l'arthrose mais le rôle du tissu osseux dans cette pathologie reste encore marginal. Les tentatives réalisées jusqu'à maintenant pour essayer de trouver un rôle possible de l'os sous-chondral dans l'arthrose se sont limitées à des observations radiographiques et histologiques. Peu de travail a été fait sur le métabolisme de cet os. Donc l'étude du métabolisme de l'os sous-chondral arthrosique serait essentiel pour comprendre le comportement de ce tissu chez les patients arthrosiques versus normaux.

Notre hypothèse de travail est que le tissu de l'os sous-chondral est intimement impliqué dans l'apparition et/ou la progression de l'arthrose du genou. En particulier, nous proposons que les ostéoblastes arthrosiques ont un fonctionnement anormal qui perturbe le métabolisme général de ce tissu, et que ceci est responsable de la sclérose osseuse observée chez les patients arthrosiques.

Nos objectifs principaux étaient :

I) d'étudier les deux systèmes les plus importants dans le remodelage osseux soit le système IGF-1/IGFBPs et le système uPA/plasmine. Ces deux systèmes seront tout d'abord étudié à partir d'explants *ex-vivo* de l'os sous-chondral provenant du plateau tibial interne de patients arthrosiques. Les expériences faites sur ce tissu reflèteront le comportement *in vivo*. Les paramètres mesurés seront : l'uPA (protéine et activité), le PAI-1, l'IGF-1 et l'ostéocalcine. Ces paramètres seront toujours comparés à ceux des explants provenant d'individus normaux.

II) i) de mettre au point une technique pour cultiver des ostéoblastes arthrosiques et normaux provenant de plateaux tibiaux internes. ii) d'étudier le phénotype des ostéoblastes arthrosiques tout en le comparant à celui des ostéoblastes normaux. La caractérisation de ces cellules a été réalisée en mesurant les paramètres suivants : l'activité de la phosphatase alcaline, la synthèse de l'ostéocalcine et la formation de l'AMPc suite à des stimulations par la PTH et par la PGE₂; iii) de mesurer dans les ostéoblastes en cultures primaires les mêmes paramètres déjà mesurés avec des explant *ex-vivo*, si ces derniers montrent une anomalie. Cette étude nous permettra de vérifier si cette anomalie était due à un facteur systémique emporté avec les explants ou à un défaut primaire dans les ostéoblastes.

III) d'étudier le rôle de l'IGF-1 en déterminant les niveaux d'IGF-1 et des IGFBPs produits par les ostéoblastes arthrosiques versus des ostéoblastes normaux. Le rôle de l'IGF-1 dans la régulation du système uPA/plasmine a aussi été étudié.

B:MANUSCRITS





Originally trained as a miniaturist and manuscript illuminator, Flemish artist Jan van Eyck (c 1390–1441), using the new medium of oil paint, achieved masterpieces of brilliant color and uncanny detail. In this detail from “The Virgin and the Canon Van der Paele,” the canon, who was the donor of the painting, is portrayed kneeling at the feet of Saint George.

The precisely delineated portrait of Canon Van der Paele has long been of interest to the medical community. According to Professor Jan Dequeker, historical documents concerning the canon support a diagnosis of polymyalgia rheumatica (severe muscular pain and stiffness) and temporal arteritis (an inflammation of the arteries of the temple), visible in this painting. The canon suffered from rheumatic pain with morning stiffness along with general weakness and ill health, which toward the end of his life prevented him from attending church services. Dequeker suggests that “this is van Eyck’s version of a medical certificate to excuse the canon’s absence from church. It is still valid more than 500 years later, for it accurately depicts the signs of his illness and enables us to make the diagnosis.”

Reference

Canadian Medical Association Journal. 1981;124:1597–1598.

Detail from “The Virgin and the Canon Van der Paele” (1436) by Jan van Eyck; from the collection of the Groeningemuseum, Bruges, Belgium; photographed by J. Maertens, Bruges.



OSTEOBLAST-LIKE CELLS FROM HUMAN SUBCHONDRAL OSTEOARTHRITIC BONE DEMONSTRATE AN ALTERED PHENOTYPE IN VITRO

Possible Role in Subchondral Bone Sclerosis

GEORGE HILAL, JOHANNE MARTEL-PELLETIER, JEAN-PIERRE PELLETIER,
 PIERRE RANGER, and DANIEL LAJEUNESSE

Objective. Osteoarthritis (OA) is accompanied by subchondral bone sclerosis. The present study was undertaken to determine whether osteoblast-like cells in patients with OA show an abnormal phenotype that could contribute to this sclerosis.

Methods. Explants and primary in vitro osteoblast-like cell cultures were prepared from subchondral bone specimens from OA patients or from bone removed at autopsy from individuals showing no signs of OA or metabolic bone disease. We measured the abundance and activity of urokinase plasminogen activator (uPA), and the levels of PA inhibitor (PAI-1) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in conditioned media from both explants and osteoblast-like cells. The expression of osteoblast phenotypic biomarkers was also evaluated.

Results. OA explants showed increased levels and activity of uPA, no changes in PAI-1 abundance, and increases in IGF-1 release, as compared with preparations from normal individuals. In vitro primary

osteoblast-like cells showed results similar to the ex vivo findings for uPA, PAI-1, and IGF-1. Primary OA osteoblast-like cells also expressed higher alkaline phosphatase activity and osteocalcin release than normal cells, both under basal conditions and with 1,25(OH)₂D₃ (1,25-dihydroxyvitamin D) stimulation. Conversely, OA osteoblast-like cells showed blunted cAMP synthesis in response to human parathyroid hormone and prostaglandin E₂ in contrast to the finding with normal osteoblast-like cells, a result that could not be attributed to altered adenylate cyclase activity.

Conclusion. Ex vivo and in vitro results indicate similar altered activities of OA osteoblasts as compared with normal cells. This suggests that an altered phenotype of subchondral osteoblasts may be a contributing factor in human OA.

Osteoarthritis (OA) is the leading cause of disability among persons over 65 in the general population (1). Although major progress has been made in the last few years (2,3), we still have much to learn about the etiology, pathogenesis, and progression of this disease. Factors such as the slow progression and the multifactorial nature of the disease have limited our comprehension of OA. However, we do know that it involves changes in articular cartilage and surrounding bone, and an imbalance between loss of cartilage (due to matrix degradation) and an attempt to repair this matrix (4,5). The specific interaction between bone and cartilage is still not clearly defined, nor do we know why chondrocytes cannot adequately repair the cartilage matrix. OA can be described as the degradation and loss of articular cartilage, accompanied by hypertrophic bone changes

Supported by the Kidney Foundation of Canada, the Fondation Notre Dame, and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec "Équipe Prioritaire." Dr. Lajeunesse is a Senior Scholar of the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec." Mr. Hilal is a student grantee of the "Unité de Recherche en Arthrose, Centre de Recherche L. C. Simard."

George Hilal, MSc, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Jean-Pierre Pelletier, MD, Daniel Lajeunesse, PhD: Centre de Recherche L. C. Simard, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; Pierre Ranger, MD: Hôpital Sacré-Coeur, Montreal, Quebec, Canada.

Address reprint requests to Daniel Lajeunesse, PhD, Unité de Recherche en Arthrose, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Pavillon Notre-Dame, Centre de Recherche L. C. Simard, 1560 rue Sherbrooke Est, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada.

Submitted for publication October 15, 1997; accepted in revised form December 14, 1997.

with osteophyte formation and subchondral plate thickening (4,5).

Risk factors for OA in humans include older age, female sex, genetic predisposition, mechanical stress and/or joint trauma, and obesity (3,6,7). Increased bone density may also be viewed as a risk factor for this disease. Indeed, the integrity of the overlying articular cartilage depends on the mechanical properties of its bony bed (8,9). Results of a study by Carlson et al, using a primate (*Macaca fascicularis*) model of OA, indicated that alterations of the bony bed may precede cartilage changes (10,11). Evidence for and against this hypothesis has recently emerged both from animal model studies (12–15) and from clinical trials (16–20). However, bone sclerosis may also be due to a dysregulation of bone remodeling. Indeed, trabecular thickening in subchondral bone is accompanied not always by increased bone mineralization, but sometimes by increases in osteoid volume (16,20). Hence, this would support the concept of a bone cell defect in this disease, as proposed by Gevers et al (21,22).

Subchondral bone stiffness in OA could be part of a more generalized bone alteration leading to increased bone mineral density and/or volume in affected joints. Indeed, OA is not frequent in patients with osteoporosis (23–25), who have low bone mineral density, while human osteopetrosis, a condition associated with bone sclerosis (26), is associated with OA in patients who reach adulthood despite their osteopetrotic condition (27). Investigators at our laboratory have recently shown that 2 human cases of malignant osteopetrosis were due to an osteoblast defect as measured in primary cultures of osteoblast-like cells (28). These osteoblast-like cells showed altered production of osteocalcin, a bone-specific protein, and increased alkaline phosphatase production when compared with normal osteoblast-like cells. Finally, OA patients have better-preserved bone mass (29–32), independent of body weight (33–36), suggesting that OA may initially be a bone disease.

Using primary osteoblast-like cell cultures prepared from subchondral bone plate specimens of OA patients' tibial plateaus, we investigated whether an osteoblast defect was part of the expression of this disease. The production of alkaline phosphatase, osteocalcin, cAMP in response to hormonal challenge, urokinase plasminogen activator (uPA), and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) was aberrant in these cells in comparison with osteoblast-like cells prepared from normal subchondral bone specimens. These findings suggest that OA osteoblasts have altered phenotypic

characteristics that may contribute to the onset and/or progression of the disease.

PATIENTS AND METHODS

Patients and clinical parameters. OA samples were obtained from 9 patients (3 men, 6 women) undergoing total knee joint replacement, and tibial plateaus were isolated under sterile conditions. The patients ranged in age from 53 to 82 years (mean \pm SD 68.9 ± 3.5 years), and were diagnosed as having OA based on the criteria developed by the American College of Rheumatology (37). The specimens represented moderate-to-severe OA as defined according to macroscopic criteria. Surface fibrillation and pitting were prominent, along with eburnation of variable size. No patient had received medication that would interfere with bone metabolism, including corticosteroids, for 6 months prior to surgery, nor were nonsteroidal antiinflammatory drugs administered within the last week before surgery. Specimens were obtained, and cell cultures prepared, within 6 hours following surgery.

Normal bone specimens were obtained from plug explants of medial tibial plateaus collected at autopsy, within 12 hours of death, from 4 men and 1 woman between the ages of 46 and 73 years (mean \pm SD 61.3 ± 6.3 years). It was established that these control subjects had no history of joint disease or bone metabolic disease, and had not been taking medication that would interfere with bone metabolism. Individuals showing cartilage deterioration were not included in the normal group.

Preparation of subchondral bone explants and primary bone cell cultures. Medial tibial plateaus were extracted to prepare explants and primary bone cell cultures; no marginal cortical bone tissue was included. The overlying cartilage was first removed from tibial plateaus, and plug explants were dissected out exclusively from the midportion of the medial plateau. The trabecular bone tissue was then dissected away from the subchondral bone plate. All manipulations were performed under a magnifying microscope to ensure complete removal of cartilage and trabecular bone. The subchondral bone plate of tibial plateau specimens was then separated into 2 portions. The subchondral bone specimens from normal individuals were consistently thinner than those from OA patients, which showed evident sclerosis (results not shown).

The first group of specimens was used to prepare *ex vivo* bone samples of 100–200 mg wet weight for explant culture. Explants were washed 3 times by vortexing samples in serum-free BGJ medium (Sigma, St. Louis, MO). The explants were cultured in the same medium at 37°C in a humidified atmosphere with 5% O₂/95% CO₂. Conditioned media were recovered after 5 days of culture under these conditions, and stored at –80°C prior to assay.

The second portion of the samples was used to prepare primary cell cultures as previously described (28,38), with minor modifications. Briefly, bone samples were cut into small pieces (2 mm²) prior to their sequential digestion in the presence of 1 mg/ml type I collagenase (Sigma) in Ham's F-12/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) without serum, at 37°C for 20, 20, and 240 minutes. This removes both adherent and remaining bone marrow cells from the cortical bone pieces.

After washing with the same medium, the digested bone pieces were cultured in BGJ medium containing 20% fetal bovine serum (FBS; Wisent, St. Bruno, Quebec, Canada). This medium was replaced every 2 days until cells were observed in the Petri dishes, at which time the culture medium was replaced with fresh medium containing 10% FBS. At confluence, cells were passaged once at a ratio of 25,000 cells/cm² and grown in 24-well plates (Falcon, Lincoln Park, NJ) for 5 days prior to assay. It was previously demonstrated that cells obtained under these culture conditions show an osteoblast-like cell phenotype (28,38). Conditioning was performed for the last 2 days of culture, in the presence or absence of 50 nM 1,25(OH)₂D₃ (1,25-dihydroxyvitamin D; generous gift of Dr. M. Uskokovic, Roche, Nutley, NJ) for maximal stimulation, in Ham's F-12/DMEM containing 2% charcoal-stripped FBS, which yields maximal stimulation of alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion (28,38). The medium was collected at the end of the incubation and frozen at -80°C prior to assay. Cells were then washed twice with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, and solubilized in alkaline phosphatase buffer (100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 1% Triton X-100; pH 10.5) for 60 minutes with agitation at 4°C.

Phenotypic characterization of primary osteoblast-like cells: cAMP, osteocalcin, and cellular alkaline phosphatase determination. For cAMP determination, cells were preincubated for 15 minutes in the presence of a phosphodiesterase inhibitor (1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine; Sigma), in Ham's F-12/DMEM containing 0.5% bovine serum albumin (fatty acid-free fraction V; Sigma). At the end of the preincubation, cells were incubated for 5 minutes in the same medium, containing either 100 nM human parathyroid hormone fragment 1-34 (PTH; Peninsula, Belmont, CA), 5 nM prostaglandin E₂ (PGE₂; Sigma), 1 μM forskolin (Sigma), or vehicle, and the reaction was stopped with 3% perchloric acid (final concentration). Cyclic AMP levels were then evaluated by radioimmunoassay (Diagnostic Products, Los Angeles, CA) as previously described (38,39).

Osteocalcin release was measured in conditioned Ham's F-12/DMEM (1:1) prepared for the last 2 days of culture of osteoblast-like cells as previously described (28,38-40), containing 2% charcoal-treated FBS, and in the presence of 50 nM 1,25(OH)₂D₃ or vehicle (0.1% ethanol). Nascent osteocalcin was determined using a specific enzyme immunoassay (Biomedical Technologies, Stoughton, MA). The detection limit of this assay is 0.5 ng/ml, and 2% charcoal-treated FBS contains <0.1 ng/ml osteocalcin. Cellular alkaline phosphatase activity was determined, on cells used for osteocalcin release, as the release of *p*-nitrophenol hydrolyzed from *p*-nitrophenyl phosphate (12.5 mM final concentration) at 37°C for 30 minutes after solubilizing the cells in alkaline phosphatase buffer as described above. Alkaline phosphatase was determined immediately on aliquots. Protein determination was performed by the bicinchoninic acid method (41).

Determination of uPA abundance and activity, and levels of PA inhibitor (PAI-1) and IGF-1, in bone explants and cell cultures. For studies of uPA, PAI-1, and IGF-1, we used conditioned media from subchondral bone explants (100-200 mg wet weight per explant tested, 5 days of conditioning) and from confluent osteoblast-like cells fed with Ham's F-12/DMEM, without FBS, but containing 1% insulin-transferrin-

selenium mix (ITS; Sigma) for the last 2 days of culture. First, uPA abundance was determined by a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; American Diagnostica, Greenwich, CT). We then used the procedure of LePrince et al (42) to determine the activity of uPA via the hydrolysis of the specific substrate DL-Val-Leu-Arg-*p*-nitroanilide (Sigma), which releases *p*-nitroaniline that can be detected at 405 nm. PAI-1 abundance was determined by ELISA, using materials available from American Diagnostica (Greenwich, CT). IGF-1 was determined using a high-sensitivity ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX) that does not cross-react with insulin. Internal control studies were performed with the media alone containing 1% ITS, and values were below the limit of detection. For the conditioned medium of bone explants, samples were processed directly, whereas for cell culture samples, 3 or 4 supernatants were pooled, lyophilized, and then reconstituted in PBS buffer, pH 7.4. Samples were then treated according to the method described by Mohan et al (43).

Statistical analysis. Results are expressed as the mean ± SEM of *n* separate cultures from normal or OA preparations. Assays were performed in duplicate for explants from individual patients, and in triplicate for cell cultures, except where indicated. Statistical analysis was performed by 2-tailed Mann-Whitney U test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Phenotypic expression of primary osteoblast-like cells. Following bacterial collagenase digestion, bone chips were devoid of adherent marrow, and cells began to migrate out of the explants after 7-14 days of culture. At 4-6 weeks of culture, the cell cultures became confluent, at which point they were split once and plated at high density (25,000 cells/cm²) before starting experimental procedures. Osteoblasts possess surface receptors for PTH and PGE₂ which are linked to adenylate cyclase (44). In primary osteoblast-like cell cultures, incubation with these agents triggers cAMP synthesis (38,40,44). Primary osteoblast-like cells from normal samples showed the expected 3-4-fold increase in cAMP formation in response to maximal doses of PTH (38-40), and a 2-fold increase in response to maximal doses of PGE₂ (Figure 1). In contrast, the response of OA osteoblast-like cells to PTH was only 50% as great as the normal response, although PTH significantly enhanced cAMP formation in these cells. Moreover, OA osteoblast-like cells had virtually no response to PGE₂ (Figure 1). This result cannot be attributed to abnormal adenylate cyclase activity in OA osteoblast-like cells since treatment with 1 μM forskolin (maximal effective dose), which directly stimulates this enzymatic complex, similarly enhanced cAMP formation in both normal cells (mean ± SEM 592.7 ± 117.6 pmoles/mg protein/5

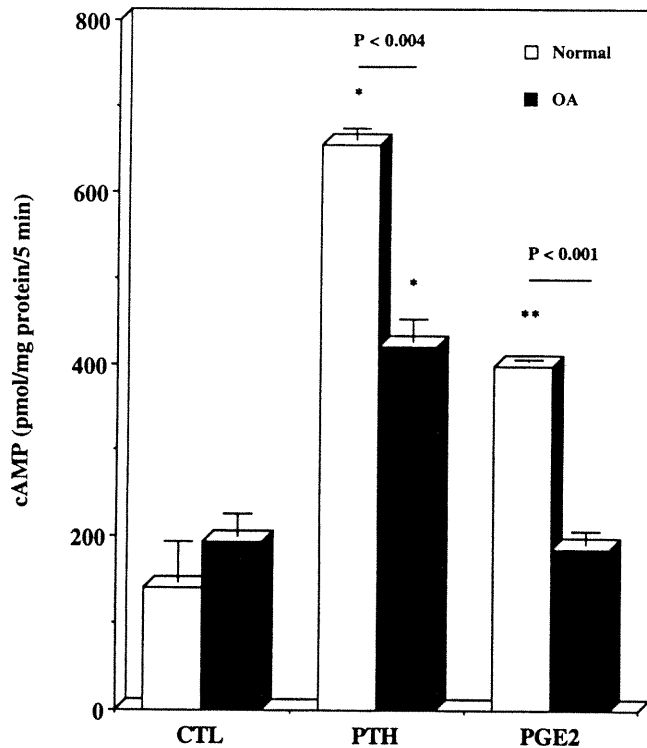


Figure 1. Production of cAMP in response to hormonal stimulation in human primary osteoblast-like cells. Primary normal and osteoarthritis (OA) cells were incubated for 5 minutes in the presence of either human parathyroid hormone (PTH; 100 nM), prostaglandin E₂ (PGE₂; 5 nM), or vehicle (control; CTL). Cyclic AMP content was determined by radioimmunoassay, in quadruplicate dishes per condition per experiment. Values are the mean and SEM. * = $P < 0.01$, versus the respective vehicle-treated controls.

minutes) and OA cells (596.6 ± 59.1 pmoles/mg protein/5 minutes) by ~ 3 – 5 -fold.

Alkaline phosphatase and osteocalcin production by primary cell cultures. Primary bone cell cultures from normal subjects and OA patients showed a normal response to stimulation with 1,25(OH)₂D₃ (50 nM) (Figures 2 and 3). However, alkaline phosphatase levels in OA cells were higher than those in normal cells following hormonal stimulation, whereas levels in normal cells were within the range previously observed under basal conditions and with 1,25(OH)₂D₃ stimulation (28,38). A similar trend was observed with regard to alkaline phosphatase levels measured under basal conditions (Figure 2). The determination of intact osteocalcin, which reflects de novo synthesis of this bone-specific protein (45), also revealed an alteration in OA cells (Figure 3): whereas there were no differences in basal osteocalcin production between normal and OA cells,

OA osteoblast-like cells showed an increased production of intact osteocalcin in response to stimulation with a maximal dose of 1,25(OH)₂D₃ (Figure 3). Indeed, normal cells showed similar levels of 1,25(OH)₂D₃-induced osteocalcin as previously reported (28,38), while OA cells clearly showed an increased production of osteocalcin. These differences between normal and OA cells could not be due to a variance in cell density and/or number, which has been shown to influence osteocalcin secretion (38) or to differences in protein content per dish (data not shown).

Production of uPA, PAI-1, and IGF-1. *Results with subchondral bone explant cultures.* The urokinase plasminogen activator/plasmin system is a key element in local bone remodeling (46). It links bone resorption with bone formation by locally stimulating protease systems, and releasing trapped growth factors in bone specimens. Having previously shown that the level of these enzymes is increased in OA cartilage (47), we investigated whether their level was also affected in OA subchondral bone. Conditioned media from OA sub-

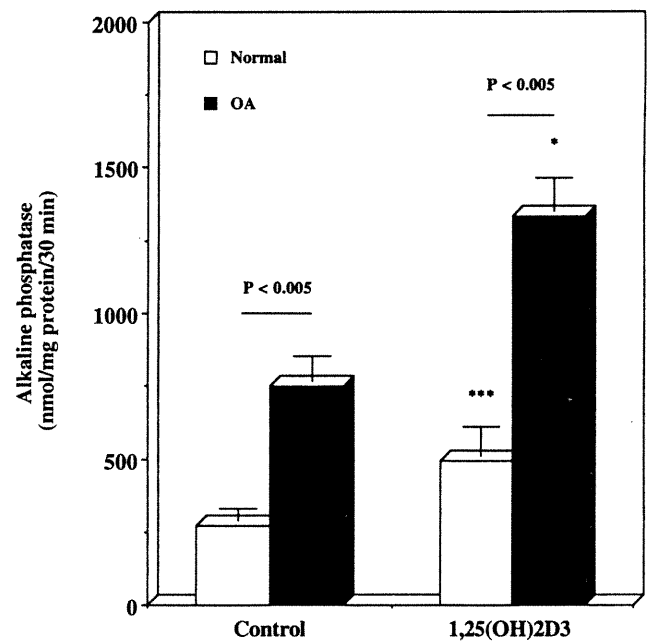


Figure 2. Cellular alkaline phosphatase activity of primary osteoblast-like cells. Normal and osteoarthritis (OA) osteoblast-like cells were grown to confluence and left untreated or treated with 50 nM 1,25(OH)₂D₃ (1,25-dihydroxyvitamin D) for 48 hours in Ham's F-12/Dulbecco's modified Eagle's medium containing 2% charcoal-treated fetal bovine serum. At the end of the incubation, alkaline phosphatase activity was determined in quadruplicate dishes per experiment, using *p*-nitrophenyl phosphate. Values are the mean and SEM. * = $P < 0.005$; *** = $P < 0.05$, versus the respective untreated controls.

chondral bone explant cultures showed an increased protein abundance and activity for uPA as compared with normal explant cultures (Figure 4, top panel). This increase, measured by ELISA, was paralleled by an up-regulation (~2-fold) of uPA enzymatic activity in OA versus normal osteoblast-like cells (Figure 4, top panel). In contrast to uPA, the production of PAI-1 was not significantly changed in conditioned media from OA and normal bone explant cultures (407.7 ± 86.6 versus 482.2 ± 90.4 ng/gm wet weight, respectively). Conversely, conditioned media from OA explant cultures showed higher levels of IGF-1 than normal bone explants (Figure 5, top panel). The release of uPA, PAI-1, and IGF-1 in conditioned media of bone explant cultures cannot be attributed to either cell damage or cell death, since we detected very low levels of lactate dehydrogenase, a cytosolic enzyme (40.8 ± 13.6 IU/liter; reference range in serum 100–190). Moreover, cycloheximide used at a physiologically relevant dose of $10 \mu\text{g/ml}$ prevented the release of these peptides (not shown).

Results with primary osteoblast cell cultures. OA osteoblast-like cells released ~3–4 times more uPA than normal osteoblast-like cells (Figure 4, bottom panel), as

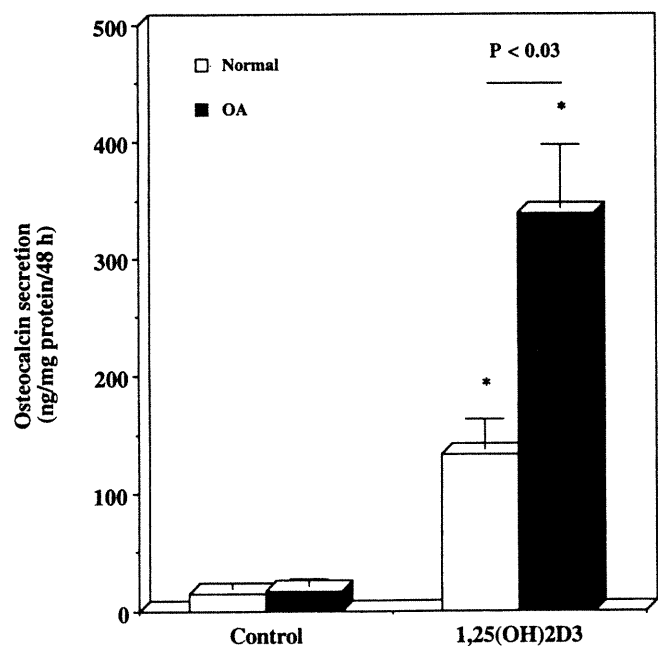


Figure 3. Secretion of intact osteocalcin by human primary osteoblast-like cell cultures. The supernatant (quadruplicates) of cells treated with or without $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, as in Figure 2, was used for determination of osteocalcin release. Osteocalcin was determined by enzyme immunoassay. Values are the mean and SEM. * = $P < 0.008$ versus the respective untreated controls.

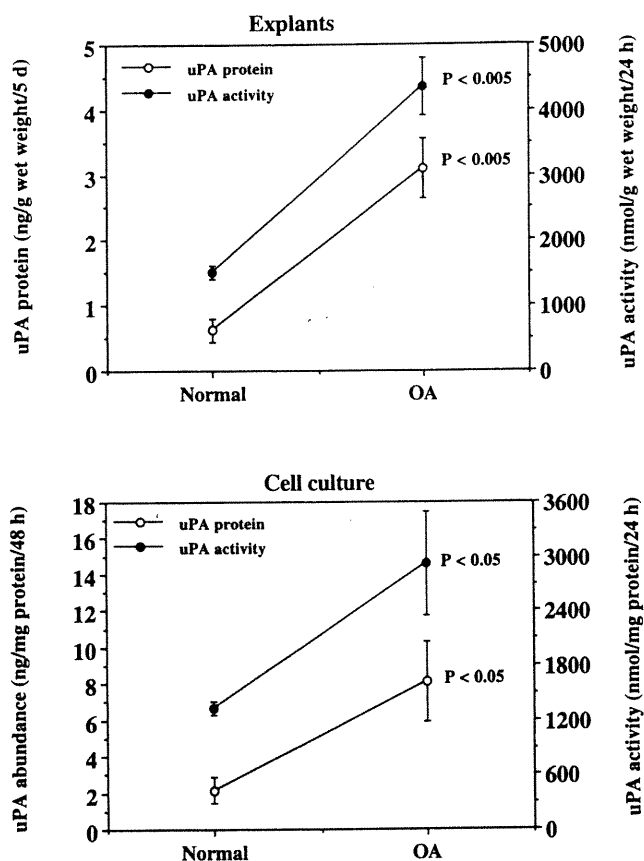


Figure 4. Urokinase plasminogen activator (uPA) abundance and enzymatic activity in conditioned media from subchondral bone explants from subjects and osteoarthritis (OA) patients (top panel), and in primary osteoblast-like cell cultures (bottom panel). Conditioning of bone explants was performed for 5 days, whereas normal and OA osteoblast-like cells grown to confluence were incubated for the last 2 days of culture in serum-free Ham's F-12/Dulbecco's modified Eagle's medium. Levels of uPA were determined in these conditioned media by enzyme-linked immunosorbent assay (abundance) or using a specific peptide substrate. Values are the mean \pm SEM.

measured by ELISA. Cycloheximide totally abrogated the release of uPA in both OA and normal cell cultures (0.16 ± 0.03 ng/mg protein in OA cultures versus 0.06 ± 0.06 ng/mg protein in normal cultures; difference not significant), indicating that this activity was due to de novo synthesis. Similarly, as with bone explant cultures, conditioned media from OA and normal osteoblast-like cell cultures showed no significant difference in PAI-1 production ($6,747.9 \pm 376.9$ ng/mg protein/48 hours versus $5,456 \pm 766.3$ ng/mg protein/48 hours, respectively). In contrast, OA osteoblast-like cell cultures released more IGF-1 than normal osteoblast-like cells under similar culture conditions (Figure 5, bottom panel).

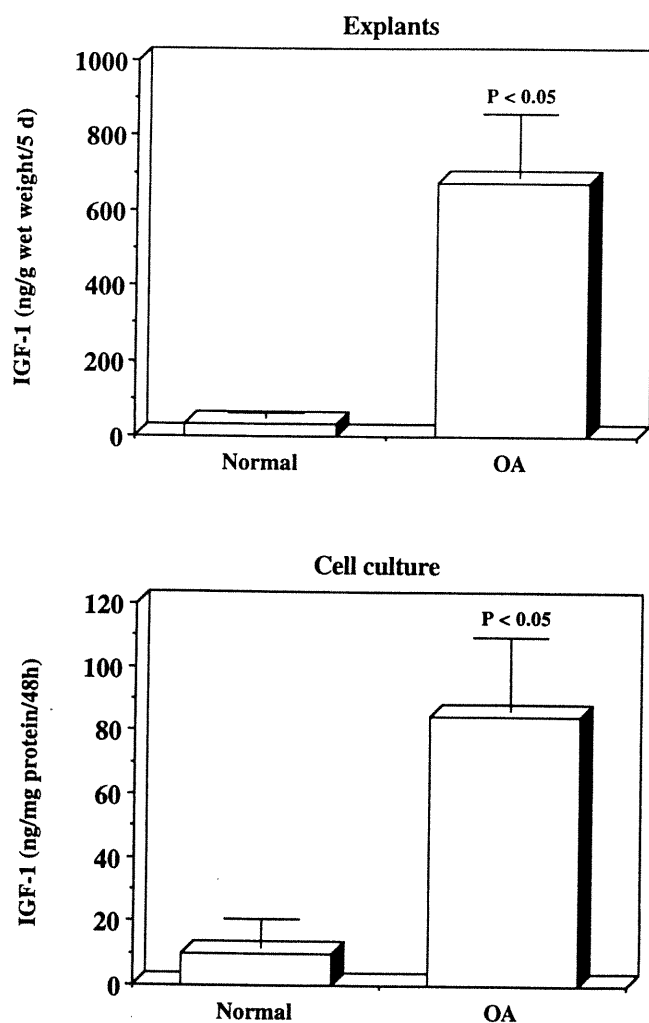


Figure 5. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) release in conditioned media from subchondral bone explants from normal subjects and osteoarthritis (OA) patients (top panel), and in primary osteoblast-like cell cultures (bottom panel). Conditioning of bone explants was performed for 5 days, whereas normal and OA osteoblast-like cells grown to confluence were incubated for the last 2 days of culture in serum-free Ham's F-12 Dulbecco's modified Eagle's medium. Conditioned media from 3 or 4 dishes of primary cells per condition were pooled, lyophilized, and then resuspended in phosphate buffered saline prior to assay. IGF-1 levels were determined in duplicate in all conditioned media and lyophilized samples, by enzyme-linked immunosorbent assay. Values are the mean and SEM.

Hence, these results suggest that osteoblasts are responsible for the release of uPA, PAI-1, and IGF-1 by bone explants in culture.

DISCUSSION

This study is the first to show that the activity of *in vitro* osteoblast-like cells is altered in human OA

patients when compared with normal, age-matched individuals. Moreover, the release of uPA, PAI-1, and IGF-1 by *ex vivo* subchondral bone explants from normal subjects and OA patients revealed results similar to those found in primary osteoblast-like cell cultures. This suggests that the behavior of primary osteoblast-like cells reflects the *ex vivo* explant behavior, which provides a good indication of the *in vivo* situation since cells in *ex vivo* explants were not damaged, as assessed by the low levels of lactate dehydrogenase in their conditioned media. Likewise, cycloheximide abrogated the release of uPA in both explants and osteoblast-like cell cultures, indicating that its release is a dynamic process. The phenotypic alterations present in OA osteoblasts *in vitro* may partly explain, if these results reflect the *in vivo* situation, the abnormal mineralization/bone mass observed in the subchondral bone compartments of patients with OA (8,21,29,30,34,35). Phenotypic alterations in OA osteoblast-like cells may be caused by a primary defect in these cells, or may be a secondary response to local chemical and/or systemic factors *in vivo*. However, under the present conditions of long-term *in vitro* culture, the effect of systemic or local factors could not explain the observed cellular defects in OA osteoblasts, since these factors would no longer influence the cells.

Indeed, the production of cAMP in response to PTH and PGE₂ indicates that there is a functional uncoupling between hormonal induction and receptor-mediated response in OA, or that the second messenger pathway is altered in these cells. Although PTH levels are within normal limits for OA patients, this parameter is somewhat higher in OA versus osteoporosis patients (48), and synovial fluids from OA patients contain high levels of PTH-related peptide (PTHrp) (49), suggesting that there may be a functional resistance to PTH/PTHrp in these patients. Hence, this hypothesis could explain our *in vitro* results showing a blunted response to PTH in OA osteoblast-like cells versus normal cells. Conversely, an alteration of the cAMP second messenger pathway is very unlikely since stimulation with forskolin, which bypasses receptor-mediated signals and directly stimulates the adenylate cyclase system, produced a similar response in OA and normal osteoblast-like cells. This would suggest that there is a functional uncoupling of the receptor-mediated signal. Moreover, since both PTH and PGE₂ responses were blunted in OA osteoblast-like cells, it could indicate that both types of receptors are down-regulated—albeit to a different extent—in these cells, or that a similar mechanism, as yet unidentified, reduces the interaction with their respective receptors. Long-term exposure to higher levels of

ALTERED PHENOTYPE OF HUMAN OA OSTEOBLAST-LIKE CELLS

PTH/PTHrp and/or PGE₂ in vivo could desensitize the cells to both agents via heterologous desensitization. However, it seems unlikely that, after a few weeks of in vitro cell culture, these cells could still express this "acquired" trait.

Conversely, alkaline phosphatase and osteocalcin release by OA as compared with normal osteoblasts was increased. It is important to note that sex-related differences in response to 1,25(OH)₂D₃ in vivo have been described in rats, with males showing greater response to the hormone treatment (50). Given that the proportion of males was higher in our normal group than in our OA group, this should be reflected by higher responses to this hormone treatment in the normal group, which was clearly not the case. However, as indicated by Ornoy et al (50), these sex-related differences in 1,25(OH)₂D₃ effect in rats were related to indirect effects of sex steroid hormones, a situation that would not prevail in vitro. Moreover, both basal and 1,25(OH)₂D₃-stimulated alkaline phosphatase activities were higher in OA osteoblast-like cells, suggesting that it is not the hormonal induction per se that is altered.

Increased alkaline phosphatase activity and osteocalcin release in OA cells, if they reflect the in vivo situation (as would be expected, given the results reported by Gevers et al and Raymaekers et al [21,22,51]) may indicate abnormal bone quality in these patients. Indeed, Ducy et al demonstrated that osteocalcin-deficient (knockout) mice showed increased bone formation in vivo compared with wild-type mice, as well as higher bone mass and improved functional quality of bone (52). Their findings indicate that osteocalcin functions to limit bone formation without directly impairing bone resorption or mineralization. However, the increase in bone formation rate is not accompanied by an increase in osteoblast surface, indicating that each osteoblast is laying down more matrix in osteocalcin-deficient animals. This in turn would suggest that OA osteoblast-like cells are laying down less mineralized matrix than normal cells, providing evidence in favor of the notion of less-mineralized bone tissue in OA.

Gevers and colleagues (21,22) have demonstrated elevated serum osteocalcin levels in women with OA of the hand, and a significant increase in trabecular bone density, stiffness, and compressive strength in iliac crest samples, implying that a bone metabolic disease may be part of this pathology. Raymaekers et al (51) also found alteration of the mineralization profile and osteocalcin concentrations in OA cortical iliac crest bone specimens. Here, our observations of an increase in de novo osteocalcin synthesis by OA osteoblast-like cells in

vitro provide evidence that the higher level of circulating osteocalcin observed in OA patients is not the result of increased bone resorption, but rather an up-regulation in production per cell (or an augmentation in the osteocalcin production and number of cells). Considering the findings of Ducy et al (52), our results also imply that the bones of OA patients suffer impaired functional quality when compared with those of normal individuals. Conversely, the increased synthesis of osteocalcin and alkaline phosphatase may reflect a generalized elevation in OA osteoblast-like cell metabolic capacities. This would explain the higher osteoid volume found in OA patients (16,20), but would not necessarily translate into higher functional quality of bone or increased mineralization. Indeed, a recent hypothesis by Li and Aspden (53) suggests that OA is a bone disease in which proliferation of defective bone cells results in an increase in bone stiffness, rather than bone mineral density.

In animal models of mild-to-moderate OA, changes in the bone may precede cartilage damage in vivo (10,11,13-15). Moreover, in cynomolgus macaques, the medial tibial plateau showed the greatest increase in subchondral plate thickness in OA, yet the severity of OA at this site is not affected by either sex or weight (11). In humans, OA has been associated with a thickening of subchondral bone, as well as an abnormally low mineralization pattern of the femoral head in OA patients at autopsy (20). Levels of growth factors such as IGF-1 and transforming growth factor β are also higher in bone specimens from the iliac crest of patients with knee OA, i.e., at a site distant from weight-bearing joints (54). Our results indicate a marked increase in IGF-1 secreted by subchondral bone explants from the medial tibial plateau of patients with OA, i.e., at the same site most affected by the disease in the cynomolgus macaque. Together, these findings are consistent with the notion of an association between a primary osteoblast-like dysfunction and OA. Indeed, Hannan et al (55) have suggested that the association between osteophytes and femoral bone mineral density, and the absence of an association between joint space narrowing and bone mineral density, indicate that a primary attribute of bone formation may underlie the pathophysiology of OA in women, whereas no association could be found in men. Considering the sex distribution in our normal and OA groups, and the fact that men have higher bone mineral density than age-matched women, we should have observed the reverse phenotype for our normal and OA primary osteoblast-like cell cultures if a cellular dysfunction was not present in OA osteoblast-like cells.

The uPA protease system is involved in local regulation of bone remodeling/turnover via the release of growth factors that were previously trapped in bone mineral *in vivo* (56), since this uPA activity could free IGF-1 from its binding proteins (57), and because uPA is mitogenic for osteoblast-like cells (58). Hence, the finding of increased uPA activity in OA samples could suggest that, if the *in vivo* situation reflects the *in vitro* results, there is a higher bone turnover in these patients, and possibly enhanced mitogenesis. The elevated levels of IGF-1 found in both cell cultures and explants in the present study could be attributed to this increased activity of uPA, possibly via IGF binding protein proteolysis; this hypothesis is presently under investigation. Finally, our results indicate increased production of both uPA and IGF-1 per cell in *in vitro* OA osteoblasts, which would be responsible for the higher levels obtained in OA explants. Hence, these *in vitro* results correlate with the *ex vivo* results, strongly suggesting that they reflect the *in vivo* situation. The increased uPA in OA samples was not accompanied by a similar augmentation of PAI-1, indicating first that uPA is specifically altered, and second that there is an imbalance in uPA activity in OA samples. This suggests that OA bone could experience enhanced turnover due to the increase in this protease system.

In conclusion, the etiology of osteoarthritis is most likely multigenic, but our results emphasize the role of phenotypically abnormal osteoblasts in this human disease. In turn, this also indicates that cartilage degradation in OA could follow abnormal cell growth/activity in subchondral bone tissues, a hypothesis that lends further support to the concept that a bone defect may contribute to the onset and/or progression of OA.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. M. Uskokovic of Roche for the gift of 1,25(OH)₂D₃.

REFERENCES

- Centers for Disease Control. Arthritis prevalence and activity limitations—United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:433–8.
- Dieppe P. Osteoarthritis: clinical and research perspective. *Br J Rheumatol* 1991;30 Suppl 1:1–4.
- Davies MA. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 1988;4:241–55.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 1969–84.
- Hough AJ. Pathology of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology*. 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 1945–68.
- Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. Obesity and knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* 1988;109:18–24.
- Felson DT. The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham osteoarthritis study. *Semin Arthritis Rheum* 1990;20 Suppl 1:42–50.
- Radin EL, Paul IL, Tolkooff MJ. Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum* 1970;13:400–5.
- Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop* 1986;213:34–40.
- Carlson CS, Loeser RF, Jayo MJ, Weaver DS, Adams MR, Jerome CP. Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease. *J Orthop Res* 1994;12:331–9.
- Carlson CS, Loeser RF, Purser CB, Gardin JF, Jerome CP. Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III. Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J Bone Miner Res* 1996;11:1209–17.
- Armstrong S, Read R, Ghosh P. The effects of intraarticular hyaluronan on cartilage and subchondral bone changes in an ovine model of early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1994;21:680–8.
- Dedrick DK, Goldstein SA, Brandt KD, O'Connor BL, Goulet RW, Albrecht M. A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum* 1993;36:1460–7.
- Yang C, Wolf E, Roser K, Delling G, Muller PK. Selenium deficiency and fulvic acid supplementation induces fibrosis of cartilage and disturbs subchondral ossification in knee joints of mice: an animal model study of Kashin-Beck disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:483–91.
- Oettmeier R, Arokoski J, Roth AJ, Helminen HJ, Tammi M, Abendroth K. Quantitative study of articular cartilage and subchondral bone remodeling in the knee joint of dogs after strenuous training. *J Bone Miner Res* 1992;7 Suppl 2:S419–24.
- Zysset PK, Sonny M, Hayes WC. Morphology-mechanical property relations in trabecular bone of the osteoarthritic proximal tibia. *J Arthroplasty* 1994;9:203–16.
- Hulth A. Does osteoarthrosis depend on growth of the mineralized layer of cartilage? *Clin Orthop* 1993;287:19–24.
- Shimizu M, Tsuji H, Matsui H, Katoh Y, Sano A. Morphometric analysis of subchondral bone of the tibial condyle in osteoarthrosis. *Clin Orthop* 1993;293:229–39.
- Eckstein F, Putz R, Muller-Gerbl M, Steinlechner M, Benedetto KP. Cartilage degeneration in the human patellae and its relationship to the mineralisation of the underlying bone: a key to the understanding of chondromalacia patellae and femoropatellar arthrosis? *Surg Radiol Anat* 1993;15:279–86.
- Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KPH. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991;49:20–6.
- Gevers G, Dequeker J, Martens M, van Audekercke R, Nyssen-Behets C, Dhem A. Biomechanical characteristics of iliac crest bone in elderly women, according to osteoarthritis grade at the hand joints. *J Rheumatol* 1989;16:660–3.
- Gevers G, Dequeker J, Geusens P, Nyssen-Behets C, Dhem A. Physical and histomorphological characteristics of iliac crest bone differ according to the grade of osteoarthritis at the hand. *Bone* 1989;10:173–7.
- Smith RW, Rizek J. Epidemiologic studies of osteoporosis in women of Puerto Rico and Southeastern Michigan with special reference to age, race, national origin and to other related or associated findings. *Clin Orthop* 1966;45:31–48.
- Dequeker J, Goris P, Uytendaele R. Osteoporosis and osteoarthrosis (osteoarthrosis). *JAMA* 1983;249:1448–51.
- Verstraeten A, van Ermen H, Haghebaert G, Mijs J, Geusens P, Dequeker J. Osteoarthrosis retards the development of osteoporosis. *Clin Orthop* 1991;264:169–77.

26. Marks SC Jr, McGuire JL. Primary bone cell dysfunction. In: Tam CS, Heersche JNM, Murray TM, editors. *Metabolic bone disease: cellular and tissue mechanisms*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1989. p. 49-61.
27. Milgram JW, Jasty W. Osteoporosis—a morphological study of twenty-one cases. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64A:912-29.
28. Lajeunesse D, Busque L, Ménard P, Brunette MG, Bonny Y. Demonstration of an osteoblast defect in two cases of human malignant osteoporosis: correction of the phenotype after bone marrow transplant. *J Clin Invest* 1996;98:1835-42.
29. Foss MVL, Byers PD. Bone density, osteoarthritis of the hip and fracture of the upper end of the femur. *Ann Rheum Dis* 1972;31:259-64.
30. Roh YS, Dequeker J, Muller JC. Bone mass is osteoarthritis, measured in vivo by photon absorption. *J Bone Joint Surg Am* 1974;54A:587-91.
31. Carlsson A, Nillson BE, Westlin NE. Bone mass in primary coxarthrosis. *Acta Orthop Scand* 1979;50:187-9.
32. Moore RJ, Fazzalari NL, Manthey BA, Vernon-Roberts B. The relationship between head-neck-shaft angle, calcar width, articular cartilage thickness and bone volume in arthrosis of the hip. *Br J Rheumatol* 1994;33:432-6.
33. Gotfredsen A, Riis BJ, Christiansen C, Rodbro P. Does a single local absorptiometric measurement indicate the overall skeletal status? Implications for osteoporosis and osteoarthritis of the hip. *Clin Rheumatol* 1990;9:193-203.
34. Vandermeersch S, Geusens P, Nijs J, Dequeker J. Total body mineral measurements in osteoarthritis, osteoporosis and normal controls. In: Ring EF, editor. *Current research in osteoporosis and bone mineral measurement*. London: British Institute of Radiology; 1990. p. 49.
35. Mokassa Bakumobatane L, Dequeker J, Raymaekers G, Aerssens J. Effects of osteoarthritis (OA) and body weight on subchondral cancellous bone quality of proximal tibia. *Osteoarthritis Cartilage* 1993;1:55-6.
36. Hordon LD, Stewart SP, Troughton PR, Wright V, Horsman A, Smith MA. Primary generalized osteoarthritis and bone mass. *Br J Rheumatol* 1993;32:1059-61.
37. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-49.
38. Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone* 1991;14:237-50.
39. Lajeunesse D, Frondoza C, Schoffield B, Sacktor B. Osteocalcin secretion by the human osteosarcoma cell line MG-63. *J Bone Miner Res* 1990;5:915-22.
40. Lajeunesse D. Effect of 17 β -estradiol on the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone* 1994;24:1-16.
41. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
42. Leprince P, Rogister B, Moonen G. A colorimetric assay for the simultaneous measurement of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in serum-free conditioned media from cultured cells. *Anal Biochem* 1989;177:341-6.
43. Mohan S, Bautista CM, Herring SJ, Linkhart TA, Baylink DJ. Development of valid methods to measure insulin-like growth factors-I and -II in bone cell-conditioned medium. *Endocrinology* 1990;126:2534-42.
44. Rodan GA, Rodan SB. Expression of the osteoblastic phenotype. In: Peck WA, editor. *Bone and mineral research*. Vol. II. Amsterdam: Elsevier; 1990. p. 244-85.
45. Gundberg CM, Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Osteocalcin: isolation, characterization and detection. *Methods Enzymol* 1984;107:516-44.
46. Martin TJ, Allan EH, Fukumoto S. The plasminogen activator and inhibitor system in bone remodeling. *Growth Regul* 1993;3:209-14.
47. Martel-Pelletier J, Faure MP, McCollum R, Mineau F, Cloutier JM, Pelletier JP. Plasmin, plasminogen activators and inhibitor in human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol* 1991;18:1863-71.
48. Geusens P, Dequeker J, Bouillon R. Salmon calcitonin stimulates PTH (1-84) and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in osteoporosis and osteoarthritis. In: Christiansen C, Overgaard K, editors. *Osteoporosis*. Copenhagen: Osteopress, ApS; 1990. p. 368-9.
49. Kohno H, Shigeno C, Kasai R, Akiyama H, Iida H, Tsuboyama T, et al. Synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis contain high levels of parathyroid hormone-related peptide. *J Bone Miner Res* 1997;12:847-54.
50. Ornoy A, Suissa M, Yaffe P, Boyan BD, Schwartz Z. Gender-related effect of vitamin D metabolites on cartilage and bone. *Bone* 1994;27:235-47.
51. Raymaekers G, Aerssens J, van den Eynde R, Peeters J, Geusens P, Devos P, et al. Alterations of the mineralization profile and osteocalcin concentrations in osteoarthritic cortical iliac crest bone. *Calcif Tissue Int* 1992;51:269-75.
52. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996;382:448-52.
53. Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res* 1997;12:614-51.
54. Dequeker J, Mohan R, Finkelman RD, Aerssens J, Baylink DJ. Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor β in cortical bone from the iliac crest: possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1702-8.
55. Hannan MT, Anderson JJ, Zhang Y, Levy D, Felson DT. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1993;36:1671-80.
56. Allan EH, Martin TJ. The plasminogen activator inhibitor system in bone cell function. *Clin Orthop* 1995;313:54-63.
57. Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, McMaster JH. Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 1992;130:1401-12.
58. Rabbani SA, Desjardins J, Bell AW, Banville D, Mazar A, Henkin J, et al. An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:1058-64.

Arthritis & Rheumatism

Official Journal of the American College of Rheumatology

William P. Arend, M.D.
Editor

8th June 1999

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

Fax: 514.896.4681
E-Mail: lajeunda@ere.umontreal.ca

FAXED
JUN 10 1999

RE: Manuscript # 99-287-FL/RV


Dear Dr. Lajeunesse,

We are pleased to accept for publication in *Arthritis and Rheumatism* your manuscript entitled, "Abnormal Regulation of Urokinase Plasminogen Activator by Insulin-Like Growth Factor-1 in Human OA Subchondral Osteoblasts."

You will receive a set of proofs when the galleys return from the printer. Please contact Jane Diamond, Managing Editor, if you have any questions concerning the preparation of your manuscript. She can be reached at:

The American College of Rheumatology
1800 Century Place, Ste. 250
Atlanta, GA 30345-4300
phone 404-633-3777
fax 404-633-1870

Sincerely,


William P. Arend, M.D.
Editor

Arthritis and Rheumatism Editorial Office
University of Colorado Health Sciences Center, B-117
4200 E. Ninth Avenue, Denver, CO 80262
303-315-6655 FAX 303-315-7593

**ABNORMAL REGULATION OF UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR BY
INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 IN HUMAN OSTEOARTHRITIC
SUBCHONDRAL OSTEOBLASTS.**

**George Hilal, Johanne Martel-Pelletier, Jean-Pierre Pelletier, Nicolas Duval* and
Daniel Lajeunesse.**

George Hilal, M.Sc.

Johanne Martel-Pelletier, Ph.D.

Jean-Pierre Pelletier, M.D.

Nicolas Duval, M.D.

Daniel Lajeunesse, Ph.D.

Unité de recherche en Arthrose, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Campus Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1.

* Department of Orthopaedics, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Campus Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1.

Running title: Regulation of uPA activity by IGF-1 in human osteoblasts.

Corresponding author: Daniel Lajeunesse, Ph.D., Unité de recherche en Arthrose, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Campus Notre-Dame, 1560, rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1, Telephone: (514) 281-6000 Ext. 8914 or 8907, Fax: (514) 896-4681, Email: lajeunda@ere.umontreal.ca

Relevance to rheumatology: This study is the first showing of an abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor-1 in subchondral osteoblasts of human osteoarthritis, a situation that could contribute to subchondral bone sclerosis. Our data suggest that abnormal osteoblast metabolism may have an important role in osteoarthritis, and therefore contribute to changing our perception of the etiopathogenesis of osteoarthritis.

ABSTRACT

Objective. Subchondral bone sclerosis is a common feature of osteoarthritis (OA) but the mechanisms responsible for this condition remain unresolved. We investigated the role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and urokinase plasminogen activator (uPA) in human osteoblasts (Ob) from subchondral bone of tibial plateaus of OA and normal individuals.

Methods. Primary *in vitro* Ob cells were prepared from subchondral bone specimens from OA patients and from normal individuals at autopsy. uPA and PA inhibitor-1 (PAI-1) levels were determined under basal and IGF-1 stimulation in conditioned media of Ob by ELISA. The activity of uPA was evaluated by specific substrate hydrolysis and zymography under basal conditions and plasminogen stimulation, in the presence or absence of IGF-1 addition. Plasmin activity was also evaluated by specific substrate hydrolysis.

Results. Levels of uPA released by OA Ob were significantly higher than normal. Addition of IGF-1 to Ob significantly reduced uPA protein levels only in OA ($P < 0.05$). In contrast, the addition of uPA to Ob did not modify IGF-1 levels in either normal or OA osteoblasts. Basal uPA activity was higher in OA versus normal Ob. Interestingly, IGF-1 dose-dependently enhanced basal uPA activity in OA specimens. Plasminogen addition promoted uPA activity in both normal and OA Ob, via a positive feedback loop due to plasmin generation since this activity was inhibited by both PAI-1 and α_2 -antiplasmin. Unexpectedly, incubation with IGF-1 dose-dependently inhibited this positive feedback of plasminogen-dependent uPA activity in OA Ob, whereas it did not in normal. Hence, normal Ob were relatively insensitive to IGF-1 whereas the same treatment reduced both uPA levels and plasminogen-dependent uPA activity in OA Ob while it increased basal uPA activity in OA Ob. This could not be explained by PAI-1 protein levels which were similar in normal and OA Ob in the presence or absence of IGF-1. IGF-1 also reduced plasmin activity in OA while it did not modify this activity in normal Ob.

Conclusion. These results suggest that in OA Ob, the uPA/plasmin system functions normally yet IGF-1 inhibits the positive feedback of plasmin on uPA activity. This inhibition may contribute

to abnormal IGF-1- and uPA-dependent bone remodeling ultimately leading to abnormal bone sclerosis in OA.

Recent clinical and fundamental findings suggest that the function of subchondral osteoblasts may be perturbed in diseases such as in osteoarthritis (OA). OA is the leading cause of disability among the elderly population (1). Although major progress has been made in the last few years, we still do not fully understand the etiology, pathogenesis and progression of this disease (2,3). OA is a slowly progressing disease and has a multifactorial origin. This disease can be described as the degradation and loss of articular cartilage, accompanied by hypertrophic bone changes with osteophyte formation and subchondral plate thickening (4,5). It includes changes in articular cartilage and surrounding bone, and an imbalance between loss of cartilage (due to matrix degradation) and an attempt to repair this matrix (4,5). Specific interactions between bone and cartilage have still not been clearly defined in OA, nor have the mechanisms responsible for the failure of chondrocytes to adequately repair the cartilage matrix been elucidated.

Recent evidence suggests that OA osteoblasts may produce factor(s) that can promote glycosaminoglycan release from normal cartilage *in vitro* (6). Moreover, bone tissue from OA patients produce collagen and collagenase(s) albeit at very variable levels (7). Osteocalcin, a specific protein produced by osteoblasts, was also significantly elevated in both serum and cortical bone explants of women with hand OA (8). In addition, we recently showed that human OA osteoblasts release more osteocalcin than normal cells in response to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulation and show increased alkaline phosphatase activity (9). An imbalance between collagen and non-collagen protein production, such as osteocalcin, can lead to an increase in bone volume without a concomitant increase in bone mineralization pattern. Interestingly, at the clinical stage this disease is associated with a thickening of the subchondral bone, yet an abnormally low mineralization pattern of the femoral head has been observed in OA patients at autopsy (10). Recent evidence indicating that osteocalcin knock-out mice show an increased mineralization pattern without significant effects on bone resorption (11), may then suggest that the elevated osteocalcin levels in OA could be responsible for the abnormal mineralization pattern in these patients. Moreover, in the hip cancellous bone compartment of OA patients a combination of increased gelatinase 72 kD (MMP-2) and alkaline phosphatase activity, indicating increased collagen turnover, has been

observed (12). Intensified remodeling of the subchondral bone and increased bone stiffness is also associated with the progression of cartilage degeneration (13-15).

Bone resorption and formation do not occur randomly but follow a precise remodeling schedule regulated by hormones and local growth factors. In particular, bone sclerosis observed in OA subchondral bone may be linked to abnormal insulin-like growth factor (IGF) system regulation. A well characterized protease system is involved in bone resorption, the plasminogen activators (uPA) and their inhibitors (PAI), the equilibrium of which controls the formation of plasmin (16,17). In turn, plasmin cleaves pro-urokinase into an active protease, creating a positive feedback loop for uPA activation (18). Plasmin is one of the major factors leading to the activation of latent forms of proteases and growth factors such as transforming growth factor- β (TGF- β) (19,20). In turn, this protease system may alter IGF binding proteins (IGFBPs) and promote the dissociation of the IGF/IGFBPs (21-23). Conversely, it was reported that IGF-1 may control its own bioavailability via its action on both IGFBP-3 levels and the PA/PAI system (24,25).

We recently showed that human OA subchondral bone osteoblasts produce elevated levels of both IGF-1 and uPA (9). Since IGF-1 and uPA can affect bone remodeling, we therefore investigated the relationship between both systems in human normal and OA osteoblasts. Our results indicate that uPA/plasmin functions normally in OA osteoblasts, but surprisingly IGF-1 inhibits the positive feedback loop of plasmin on uPA activity in these cells. This reflects abnormal IGF-1-induced signalling in OA osteoblasts, a situation that could lead to subchondral bone sclerosis as observed in this pathology.

METHODS

Patients and clinical parameters.

OA specimens were obtained from a total of 11 patients (3 males, 8 females) aged 71 ± 8 years (mean \pm SD) undergoing total knee replacement surgery and classified as OA according to the criteria developed by the American College of Rheumatology (26). Subchondral bone was dissected from tibial plateaus under sterile conditions as described previously (9), and the specimens represented moderate-to-severe OA as defined according to macroscopic criteria. No

patients had received medication for 6 months prior to surgery that would interfere with bone metabolism, including corticosteroids. Normal subchondral bone specimens from tibial plateaus were collected at autopsy from a total of 6 individuals (4 males, 2 females) aged 65 ± 13 years (mean \pm SD). Before using a specimen, we ensured that they did not receive medication that could interfere with bone metabolism or had any bone metabolic disease. Only individuals showing macroscopically normal cartilage were included in the normal group.

Subchondral bone primary osteoblast cell cultures.

The overlaying cartilage was first removed from tibial plateaus, and the trabecular bone tissue was dissected away from the subchondral bone plate. The subchondral bone plate of the medial tibial plateaus were dissected out as previously described (9). All manipulations were performed under a magnifying microscope to insure complete removal of cartilage and trabecular bone. Cell cultures were prepared as previously described (27,28). Briefly, subchondral bone specimens were cut into small pieces prior to their sequential digestion in the presence of 1 mg/ml collagenase type I (Sigma, St. Louis, MO) in BGJ_b media (Sigma) without serum at 37°C for 20, 20 and 240 minutes. The digested bone pieces were cultured in the same media containing 20% fetal bovine serum (FBS, Wisent Inc, St. Bruno, Québec, Canada). This medium was replaced every 2 days until cells were observed in the petri dishes. At this point, the culture medium was replaced with fresh media containing 10% FBS. At confluence, cells were passaged once at 25,000 cells/cm² in 24 wells (Falcon, Lincoln Park, NJ) and grown for 5 days before assays. We have previously demonstrated that cells obtained under these culture conditions show an osteoblast-like cell phenotype (9,27,28). Conditioning was performed for the last 2 days of culture in HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium mix (Sigma). Specific experiments were also performed in either the presence of increasing concentrations (1 to 50 ng/ml) of either human IGF-1 (Medicorp, Montréal, Québec, Canada) or uPA (Calbiochem, La Jolla, CA). Media were collected at the end of the incubation and frozen at -80°C prior to assays. Cells were then washed twice with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, solubilized in alkaline phosphatase buffer consisting of 100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 1% Triton X-100,

pH 10.5 for 60 minutes with agitation at 4°C and subsequently used for alkaline phosphatase activity and protein determination by the bicinchoninic acid method (29).

Determination of uPA, PAI-1 and of IGF-1 levels.

uPA and PAI-1 levels were determined by specific ELISA assays (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT). IGF-1 was also determined using a high sensitivity ELISA assay (Diagnostic Systems Laboratories Inc, Webster, TX) which does not show cross-reactivity with insulin. For IGF-1 determination supernatants were lyophilized and then reconstituted in PBS buffer pH 7.4, and samples were then treated according to the method described by Mohan *et al* (30).

Determination of uPA activity: modulation by IGF-1 and selective inhibitors.

To determine the activity of uPA, we used the procedure of Leprince *et al* (31) which detects the release of p-nitroaniline from the hydrolysis of the specific substrate DL-Val-Leu-Arg-p-nitroanilide (Sigma) at 405 nm. The activity of uPA was determined in the presence (plasminogen-dependent), or absence (basal), of 100 µg/ml plasminogen (Sigma) to permit the formation of plasmin and its positive feedback on uPA (18). The non-specific hydrolysis obtained with the uPA substrate, either in the presence or absence of plasminogen in the same culture media used for cell treatment, represented less than 5% of basal activity and was subtracted from our data. In one set of experiments selective inhibitors for serine proteases (leupeptin: 10 µg/ml; aprotinin: 20 µg/ml), for PA (PAI-1: 4 mM) and for plasmin (α_2 -antiplasmin; 100 ng/ml, Calbiochem) were used to assess the specificity of uPA activity in our samples and were added directly during the substrate activity assays. We also used cathepsin inhibitors (general cathepsin inhibitor I for B, L, D and S cathepsin; cathepsin B inhibitor: Calbiochem) and a metalloproteinase inhibitor (o-phenanthroline; 10 µg/ml) during substrate activity assays to determine if other proteases were present in the culture media of our normal and OA osteoblasts.

In another set of experiments, the effect of IGF-1 on uPA activity of OA osteoblasts was also evaluated. Osteoblasts were incubated for 48 hours at 37°C with increasing doses of human IGF-1 (1 to 50 ng/ml). Supernatants were then recovered and uPA activity determined in the

presence or absence of plasminogen (100 µg/ml, Sigma). Moreover the specificity of the effect of IGF-1 was tested by incubating cells in the presence of increasing doses of IGF-1 as above following a preincubation for 30 minutes prior to IGF-1 addition to the culture media with an IGF-1 receptor (IGF-1R) antibody (1 µg/ml: Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) that inhibits IGF-1 signalling. uPA activity was then determined in supernatants as described above.

Zymography of plasminogen activator.

Experiments were performed following the procedure described by Roche *et al* (32). The activity of PA is detected directly on electrophoretic gel containing plasminogen and casein. Upon hydrolysis of plasminogen into plasmin by PA, plasmin can degrade casein included in the gel. Hence, following protein staining, clear bands can be detected on the gels and indicate PA activity. Briefly, samples (25 µg per lane) were electrophoresed under nonreducing conditions in 9% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide slab gels supplemented with plasminogen (100 µg/ml) and casein (0.5 mg/ml). The resolving gel is prerun at room temperature for 30 minutes at a constant current of 25 mA. After castellating a 4.5% stacking gel, the samples are applied, and the gel run for 150 minutes at a constant current of 20 mA. The gels are washed 3 times in 2.5% Triton X-100 for 20 minutes and incubated 6 hours at 37°C in 50 mM Tris-HCl pH 7.4. The gels are then fixed, stained in Coomassie Blue (0.25%) for 10 minutes and destained overnight in 30% methanol/10% acetic acid. Clear bands over a blue background indicate PA activity, and gels are photographed on a light box.

Evaluation of plasmin activity: modulation by IGF-1.

The plasmin activity was tested by evaluating directly plasmin activity generated by normal and OA osteoblasts using a very selective chromogenic substrate from American Diagnostica Inc (H-D-Nle-HHT-Lys-pNitroaliniide: Greenwich, CT). Samples were incubated for 60 minutes at 37°C in the presence of saturating doses of the substrate, in the presence or absence of 100 µg/ml of plasminogen to promote plasmin generation. The non-specific hydrolysis of the plasmin substrate, either in the presence or absence of plasminogen, was subtracted from our data. In

another set of experiments, conditioned-media from IGF-1 treated normal and OA cells were incubated in parallel to determine the effect of IGF-1 on plasmin generation by these cells.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. For each specimen, assays were performed in triplicate and inter-assay variations were less than 5%. Statistical analysis was performed either by the paired two-tailed Mann-Whitney or Wilcoxon signed rank test for individual determinations. Dose-response experiments were analyzed by an ANOVA with repeated measures (paired) test and a difference of 0.05 was considered significant.

RESULTS

Production of uPA, PAI-1 and IGF-1.

As already shown in an earlier study (9), the total uPA protein levels (single chain uPA and active uPA) measured by ELISA were higher in OA than normal osteoblasts ($n = 5$, $P < 0.05$) (Figure 1). The addition of IGF-1 (50 ng/ml) induced a slight, yet not significant ($P > 0.1$), increase of uPA levels in normal, and interestingly it significantly reduced uPA levels in OA osteoblasts ($P < 0.015$, Figure 1, left panel). Basal PAI-1 levels were slightly lower in OA when compared with normal, however this did not reach statistical significance ($P > 0.1$, Figure 1, right panel). The addition of IGF-1 (50 ng/ml) failed to modify the PAI-1 levels in either normal and OA osteoblasts (Figure 1, right panel). We previously showed (9) that IGF-1 levels measured in the culture media under basal conditions were higher in OA versus normal osteoblasts (OA: 84.7 ± 22.9 ; normal: 9.8 ± 9.0 ng/mg protein; $P < 0.05$). Moreover, the addition of increasing concentrations (1 to 50 ng/ml) of uPA did not modify IGF-1 levels in both normal and OA osteoblasts under the present culture conditions (data not illustrated).

Modulation of uPA activity by IGF-1.

As the above results showed that IGF-1 could modulate uPA levels differently in normal and OA osteoblasts, we further investigated the modulation of uPA activity by IGF-1 in these cells. Basal uPA activity, measured by the hydrolysis of a selective substrate (DL-Val-Leu-Arg-p-

nitroanilide: Sigma), was initially higher in OA ($n = 4$) than normal ($n = 4$) (Figure 2). This result is similar to uPA protein levels (Figure 1, left panel).

In another set of experiments, the addition of increasing concentrations of human IGF-1 in the culture media of OA osteoblasts dose-dependently enhanced ($P < 0.0001$ by paired ANOVA) the activity of uPA in these cells (ED_{50} : 7.1 ± 2.2 ng/ml) (Figure 2), whereas it did not promote significantly the activity measured in normals. The addition of an antibody against the IGF-1 receptor ($1 \mu\text{g/ml}$) prevented the increase in basal uPA activity of OA, and the slopes of the dose-response between normal and OA + IGF-1R antibodies treatments were not different (Figure 2). This indicates that this growth factor's effect on uPA in OA specimens was IGF-1 receptor-mediated. The IGF-1-dependent uPA activity in OA osteoblasts was time-dependent, steadily increasing at least until 48 hours of incubation (Figure 3).

This difference in protease activity between normal and OA osteoblasts may be of clinical relevance in this disease, given that PA is a key protease activity during bone remodeling (33). Conversely, the protease activity measured may also be due to the additive effect of yet other uPA-like proteases in these samples. In order to rule out this possibility, we evaluated the effect of selective inhibitors of uPA and serine proteases to determine the specificity of this activity in IGF-1-stimulated normal and OA osteoblasts. These included PAI-1 (4mM), α_2 -antiplasmin ($2 \mu\text{g/ml}$), leupeptin ($0.5 \mu\text{g/ml}$) and aprotinin ($2 \mu\text{g/ml}$). As shown in Figure 4, the basal activity (Total) measured in both OA ($n = 4$) and normal ($n = 4$) osteoblasts was specifically inhibited in the presence of PAI-1, aprotinin and leupeptin. An inhibition of $18 \pm 5.9\%$ ($P < 0.05$) and $63.3 \pm 5.5\%$ ($P < 0.0025$) with PAI-1, $44.9 \pm 7.1\%$ ($P < 0.025$) and $73.4 \pm 4.4\%$ ($P < 0.005$) with leupeptin and $52.1 \pm 7\%$ ($P < 0.025$) and $66.3 \pm 8.6\%$ ($P < 0.01$) with aprotinin for normal and OA specimens respectively was obtained. Hence, OA specimens showed much higher uPA specific activities than normal samples as determined by the PAI-1-dependent activities obtained with these samples. In contrast, α_2 -antiplasmin failed to inhibit substrate hydrolysis by either normal or OA osteoblasts (Figure 4). Moreover, a general inhibitor of cathepsins (B, L, S and D), a selective inhibitor of Cathepsin B and a selective metalloproteinase inhibitor (o-phenanthroline)

all failed to inhibit the uPA activity in OA samples (data not shown), again indicating the specific nature of the hydrolysis measured in the presence of our substrate.

The PA/plasmin system is a complex enzymatic cascade. Although it is known that the hydrolysis of plasminogen by PA generates plasmin which can then stimulate uPA activity via a positive feedback loop (18), the regulating elements of this enzymatic system are still poorly understood, yet our results suggest that IGF-1 may influence it (see Figures 1 and 2). As IGF-1 levels are enhanced in OA osteoblasts (9) and can influence uPA levels, we next questioned whether it could also influence PA activity in normal and OA osteoblasts. Indeed our results show that IGF-1 enhanced the PAI-1-dependent (4 mM) basal uPA activity of OA specimens ($P < 0.01$ by Student t-test) whereas it did not change the activity of normal cells (Figure 5, left panel). The addition of plasminogen (100 $\mu\text{g/ml}$) to both OA ($n = 5$) and normal ($n = 4$) samples greatly enhanced uPA activity (Figure 5, right panel). However, under these conditions, the uPA activity was no longer statistically different between normal and OA ($P > 0.1$). Interestingly, although the addition of plasminogen has no effect on the IGF-1 response of uPA activity in normal osteoblasts, IGF-1 blunted the plasminogen-dependent increase in uPA activity for OA osteoblasts by about 65 to 75% ($P < 0.02$ by Student t-test) (Figure 5, right panel). Moreover, this inhibition by IGF-1 in OA Ob was dose-dependent ($n = 5$) (1 to 50 ng/ml; ED₅₀: 4.2 ± 1.6 ng/ml, $P < 0.0001$ by paired ANOVA, Figure 6), and again could be prevented by the addition of IGF-1-R antibody (Figure 6). Further experiments showed that the plasminogen-dependent activity in both normal and OA specimens was inhibitable α_2 -antiplasmin (94.5 ± 4.3 % and 93.4 ± 2.1 %) for normal and OA osteoblasts respectively, indicating that uPA activity was promoted via the generation of plasmin following plasminogen hydrolysis.

uPA activity as measured by zymography.

In order to further assess that the activity measured in the presence of plasminogen by substrate hydrolysis was due to plasmin activity, we performed gel zymographies using normal ($n = 4$) and OA ($n = 4$) specimens. Figure 7 shows a representative gel in which normal and OA osteoblasts were incubated in the presence or absence of 50 ng/ml IGF-1. The addition of

IGF-1 abrogated almost completely the uPA activity in OA samples, whereas it failed to modify the activity of normals (Figure 7). This is superimposable to the results obtained by substrate hydrolysis in the presence of plasminogen (Figure 5).

Modulation of plasmin activity by IGF-1.

We next questioned whether IGF-1 was inhibiting uPA activity or plasmin generation from plasminogen, thereby preventing plasmin's positive feedback on uPA activity. For these experiments, we used a very selective plasmin substrate from American Diagnostica Inc. Figure 8 illustrates that under basal conditions, plasmin activity was very low and there was no effect of IGF-1 addition ($P > 0.1$) on either normal or OA specimens. In contrast, upon addition of plasminogen, which stimulates plasmin production, the activities increased several fold in both normal and OA samples. Interestingly, a statistically significant increase ($P < 0.05$) was found when OA + plasminogen was compared to normal + plasminogen assays, reflecting the increased specific activity described above. The incubation of normal osteoblasts with plasminogen plus IGF-1 induced only a slight (not significant) decrease of plasmin generation when compared to the basal levels whereas this treatment blunted the generation of plasmin activity by OA cells by about 50% (Figure 8, $P < 0.05$ by Student t-test).

DISCUSSION

The PA/plasmin system plays a pivotal role in bone matrix remodeling by activating latent proteases present in the bone matrix, which in turn initiates bone resorption (19,20,33). Although plasmin was found to be directly involved in this process, the role of PA is also crucial as it produces plasmin from plasminogen. uPA regulates its own activity via a positive feedback loop whereby plasmin generated by uPA-dependent plasminogen hydrolysis can stimulate uPA activity directly (33). Our study shows that IGF-1 can block this positive feedback loop in OA osteoblasts in contrast to no effect in normal osteoblasts. If this in vitro data reflects the in vivo situation, then this mechanism could retard bone remodeling in OA ultimately leading to bone sclerosis.

Osteoblasts produce IGF-1 and possess IGF receptors (34-36). IGF-1 stimulates osteoblast replication, differentiation and matrix synthesis (34-36). This growth factor can regulate

its own bioavailability, and also modulate the activity/abundance of uPA in osteoblast-like cell models including rat osteoblasts (37) and the human osteosarcoma cell line MG-63 (24). Several laboratories have studied the effect of IGF-1 on uPA activity, but results are controversial. IGF-1 either increased, decreased or did not change uPA activity. This discrepancy between results for osteoblasts is probably due to species differences and/or results for primary versus model cell lines. Indeed, IGF-1 has no effect on rat primary osteoblasts (37) yet it can decrease uPA activity in the human MG-63 osteosarcoma cells (38,39). We previously showed that both IGF-1 and uPA basal levels are enhanced in OA compared to normal osteoblasts (9). The increased IGF-1 levels in OA pathological osteoblasts might result in elevated synthetic capacities, a situation we (9) and others (7,12) have already described. Dequeker et al previously indicated that IGF-1, IGF-2 and TGF- β , three potent stimulators of bone cell growth and differentiation, were elevated in the iliac crest bone of patients with OA of the hands (40). We also observed that TGF- β is elevated in subchondral bone explants from tibial plateaus of patients with knee OA (41). This generalized increase in growth factors acting locally in bone of OA patients may then be contributing to enhance their bone mineral density impairing the resilience of the bone as previously postulated by Dequeker et al (40). However, the abnormal regulation of uPA protein/activity may also suggest abnormal bone turnover/remodeling in these patients. In turn, this would indicate that, if this process is present in vivo, bone remodeling is abnormal in OA individuals, a situation which could explain bone sclerosis in this pathology.

In our study, IGF-1 showed two opposing end-results. IGF-1 directly stimulated basal uPA activity in OA osteoblasts, and inhibited the positive feedback loop of plasmin on uPA activity in OA but not in normal cells. Although contradictory, this could be explained by the fact that on these pathological cells, IGF-1 effect could either be due to a decreased plasmin generation and/or inhibition of plasmin activity on uPA generation per se. In OA osteoblasts, IGF-1 blunted plasmin generation ~50%, therefore explaining, at least in part, the reduction in total uPA activity measured in these pathological cells. However, plasmin activity was then reduced to similar levels as in normal osteoblasts, which suggests that uPA activity must also be affected directly by IGF-1 in OA

osteoblasts. This hypothesis is also in agreement with our results of PA zymographies. Moreover, this is not an epiphenomenon as the IGF-1 responses on uPA activity by these pathological cells were both dose- and time-dependent. These results are also attributable solely to PA, as opposed to other protease activities, as zymography revealed only one specific band of activity in both normal and OA samples. This indicates that other enzymatic activities, if present, were not responsible for this hydrolysis. Indeed, the selective inhibition by PAI-1 and serine protease inhibitors but not by cathepsin nor metalloproteinase inhibitors also suggests a specific PA effect. Importantly, it also indicates that the uPA/plasmin system is functional in both normal and OA osteoblasts.

The failure of α_2 -antiplasmin to inhibit the IGF-1-stimulated uPA activity in the absence of plasminogen addition suggests that plasmin does not hydrolyse the selective uPA substrate used in our studies, indicating that IGF-1 directly enhanced uPA specific activity in OA osteoblasts. This is confirmed by the experiment showing that the IGF-1 stimulated basal uPA activity was inhibited by PAI-1 and serine protease inhibitors. The small residual activity could also be related to other proteases, as our own results indicate very low basal plasmin activity in both normal and OA samples. In contrast, IGF-1 decreased the level of uPA protein in OA specimens but not in normals, and it reduced plasminogen-dependent uPA activity, measured either by substrate hydrolysis or zymography. This clearly indicates a reduction in PA/plasmin activity in IGF-1-treated OA osteoblasts compared with normal cells. These conditions reflect more precisely the in vivo situation, and this would indicate that OA patients may experience abnormal bone turnover/remodeling. This is especially important given that IGF-1 levels in OA osteoblasts are higher than normal and in in vitro culture can reach levels of 4-5 ng/ml (9), concentrations for which uPA activity was decreased by ~50% in the present study. Abnormal cancellous bone collagen content in OA bone has been ascribed to elevated new matrix formation (7), however, a reduction in IGF-1-dependent uPA activity could also potentially reduce collagenase production, thereby reducing collagen breakdown.

Taken together, our data strongly suggests that IGF-1 increased the specific activity of uPA in OA osteoblasts as opposed to no significant modifications in normal cells, whereas it prevented the positive feedback of plasminogen on uPA activity. The observation that IGF-1 decreased uPA protein levels in OA cells combined with the increased basal uPA activity appears controversial. Although this could reflect an elevation of the specific activity, other explanations could have applied. IGF-1 could have favored the synthesis of an abnormal uPA which could not be detectable by ELISA yet keeps its ability to hydrolyse the substrate used. Alternatively, IGF-1 may allow the synthesis of an unknown protein which can hydrolyse this uPA substrate, and/or a protein that hides the epitope recognized by antibodies used in ELISA. In turn, this modification could disable the plasminogen activation process by the PA. This would also explain, in part, why OA specimens failed to respond to plasminogen when treated by IGF-1 as opposed to a positive feedback response in its absence. Moreover, this hypothesis is further reinforced by the fact that IGF-1 dose-dependently inhibited the plasminogen hydrolysis by uPA. We showed that in the presence of plasminogen, the hydrolysis of the uPA substrate became α_2 -antiplasmin-sensitive, indicating that it was due to a direct stimulation of uPA via plasmin generation. However, in OA osteoblasts in the presence of plasminogen, IGF-1 addition induced a decrease in substrate hydrolysis, and α_2 -antiplasmin was then progressively less efficient in preventing this activity. Indeed, under these conditions, the plasminogen-dependent plasmin activity of OA osteoblasts was reduced by ~50% when cells were incubated with IGF-1.

The preincubation of OA osteoblasts with an IGF-1 receptor antibody prevented the effects of IGF-1 on both basal and plasminogen-dependent uPA activity, indicating that the IGF-1 action occurs through its receptor, further suggesting a perturbed or altered IGF-1 signaling cascade in OA osteoblasts. Preliminary data indicate a generalized reduction in secreted IGF binding protein-3, -4 and -5 in the culture media of OA Ob compared to normal (unpublished observation), further indicating that free IGF-1 would be increased. Other growth factors could be induced in OA, however only TGF- β has been evaluated to date (40,41). Cytokines may also contribute to altered bone remodeling, however studies on this subject to date are scarce and only indicated modest

changes in trabecular OA bone samples (6,42). The nature of these altered processes in OA subchondral bone osteoblasts is currently under study. Since chondrocytes from OA patients seem unresponsive to IGF-1 challenge (43) and a clinical study indicated a positive correlation between circulating IGF-1 levels and osteophyte growth and overall progression of the OA condition (44), our results could explain, in part, the mechanism of this abnormal effect of IGF-1 in the OA joint space. A direct modulation of IGF-1 synthesis and/or signalling in OA bone cells could then offer a therapeutical alternative to prevent bone sclerosis in osteoarthritis.

In summary, although OA bone is metabolically very active (7,9,12), our results indicate that OA osteoblasts show abnormal regulation of uPA/plasmin activity by IGF-1 preventing the positive feedback of plasmin on uPA. This suggests that IGF-1 secreted by OA osteoblasts could promote bone formation, yet could also prevent normal bone remodeling via the uPA/plasmin system in OA bone. In turn, the combination of these activities in vivo could explain abnormal bone mineralization and tissue sclerosis in human OA subchondral bone. Such a mechanism could also possibly be involved in other diseases where abnormal bone remodeling has been described.

ACKNOWLEDGEMENT

D. Lajeunesse is a Senior Scholar from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec". G. Hilal is a student grantee from the "Unité de Recherche en Arthrose, Centre de recherche L.C. Simard". This research was supported by The Arthritis Society of Canada grant # 505 and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec "Équipe Prioritaire".

REFERENCES

1. Center for Disease Control. Arthritis prevalence and activity limitations--United States, 1990. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1994;43:433-438.
2. Dieppe P. Osteoarthritis: Clinical and research perspective. *Br. J. Rheumatol.* 1991;30 (Suppl. 1):1-4.
3. Davies MA. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin. Geriatr. Med.* 1988;4:241-255.
4. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell, DS Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology.* 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p.1969-1984.
5. Hough AJ. Pathology of osteoarthritis. In: Koopman WJ Editor. *Arthritis and Allied Conditions. A textbook of Rheumatology.* 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p.1945-1968.
6. Westacott CI, Webb GR, Warnock MG, Sims JV, Elson CJ. Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis & Rhem.* 1997;40:1282-1291.
7. Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* 1998;101:1596-1603.
8. Gevers G., Dequeker J. Collagen and non-collagenous protein content (osteocalcin, sialoprotein, proteoglycan) in the iliac crest bone and serum osteocalcin in women with and without hand osteoarthritis. *Collagen Rel. Res.* 1987;7:435-442.

9. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro. Possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis & Rheum.* 1998;41: 891-899.
10. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcified Tissue Inter.* 1991;49:20-26.
11. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996;382:448-452.
12. Mansell JP, Tarlton JF, Bailey AJ. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *British J. Rheumatology* 1997;36:16-19.
13. Shimizu M, Tsuji H, Matsui H, Katoh Y, Sano A. Morphometric analysis of subchondral bone of the tibial condyle in osteoarthrosis. *Clin. Orthop. & Rel. Res.* 1993;293:229-239.
14. Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J. Bone Min. Res.* 1997;12:641-651.
15. Li B, Aspden RM. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Annals of the Rheum. Dis.* 1997;56:247-254.
16. Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Cell Biol.* 1988;4:93-126.

17. Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* 1991;88:1067-1072.
18. Kasai S, Arimura H, Nishida M, Suyama T. Proteolytic cleavage of single-chain pro-urokinase induces conformational change which follows activation of the zymogen and reduction of its high affinity for fibrin. *J. Biol. Chem.* 1985;260:12377-12381.
19. Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell Biol.* 1989;109:309-315.
20. Lyons RM, Bentry LE, Puschio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J. Cell Biol.* 1990;110:1361-1367.
21. Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, McMaster JH. Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinol.* 1992;130:1401-1412.
22. Koutsilieris M, Frenette G, Lazure C, Lehoux JG, Govindan MV, Polychronakos C. Urokinase-type plasminogen activator: A paracrine factor regulating the bioavailability of IGFs in PA-III cell-induced osteoblastic metastases. *Anticancer Res.* 1993;13:481-486.
23. Martin TJ, Allan EH, Fukumoto S. The plasminogen activator and inhibitor system in bone remodeling. *Growth Regulation* 1993;3:209-214.
24. Lalou C, Silve C, Rosato R, Segovia B, Binoux M. Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control

of IGF-binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells. *Endocrinol.* 1994;135:2318-2326.

25. Fawthrop FW, Oyajobi BO, Bunning RAD, Russell RG. The effect of transforming growth factor beta on the plasminogen activator activity of normal human osteoblast-like cells and a human osteosarcoma cell line MG-63. *J. Bone Min. Res.* 1992;7:1363-1371.

26. Altman R, Asch E, Block ED, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheum.* 1986;29:1039-1049.

27. Lajeunesse D, Busque L, Ménard P, Brunette MG, Bonny Y. Demonstration of an osteoblast defect in two cases of human malignant osteopetrosis: Correction of the phenotype after bone marrow transplant. *J. Clin. Invest.* 1996;98:1835-1842.

28. Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone and Mineral* 1991;14:237-250.

29. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 1985;150: 76-85.

30. Mohan S, Bautista CM, Herring SJ, Linkhart TA, Baylink DJ. Development of valid methods to measure insulin-like growth factors-I and II in bone cell-conditioned medium. *Endocrinology* 1990;126:2534-2542.

31. Leprince P, Rogister B, Moonen G. A colorimetric assay for the simultaneous measurement of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in serum-free conditioned media from cultured cells. *Anal. Biochem.* 1989;177:341-346.
32. Roche PC, Campeau JD, Shaw ST Jr. Comparative electrophoretic analysis of human and porcine plasminogen activators in SDS-polyacrylamide gels containing plasminogen and casein. *Biochem. Biophys. Acta* 1983;745:82-89.
33. Allan EH, Martin TJ. The plasminogen activator inhibitor system in bone cell function. *Clin. Orthopaedics* 1993;313:54-63.
34. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1989;18:903-918.
35. Hock JM, M. Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122:254-260.
36. Ernst M, Froesch ER. Osteoblast-like cells in a serum-free methycellulose medium form colonies: effects of insulin and insulinlike growth factor I. *Calcif. Tissue Int.* 1987;40:27-34.
37. Cheng SL, Shen V, Peck WA. Regulation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor production by growth factors and cytokines in rat calvarial cells. *Calc. Tissue Int.* 1991;49:321-327.
38. Leloup G, Delaisse JM, Vaes G. Relationship of the plasminogen activator/plasmin cascade to osteoclast invasion and mineral resorption in explanted fetal metatarsal bones. *J. Bone Miner. Res.* 1994;9:891-902

39. Lalou C, Silve C, Segovia B, Binoux M. Interactions of insulin-like growth factors (IGF) and their binding proteins with the plasminogen/plasmin activator system in cultured osteoblasts. *Ann. Endocrinol.* 1994; 55:103-107
40. Dequeker J, Mohan S, Finkelman RD, Aerssens J, Baylink DJ. Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor β in cortical bone from the iliac crest. *Arthritis & Rheum.* 1993;36:1702-1708.
41. Martel-Pelletier, J., Hilal, G., Pelletier, J.-P., Ranger, P., & Lajeunesse, D. Evidence for increased metabolic activity in human osteoarthritic subchondral bone explants [abstract]. *Arthritis & Rheum.* 1997;40 (#9 supplement):S182.
42. Lisignoli G, Toneguzzi S, Pozzi C, Piacentini A, Riccio M, Ferruzzi A, Gualtieri G, Facchini A. Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 1999;26:791-799.
43. Doré S, Pelletier JP, DiBattista JA, Tardif G, Brazeau P, Martel-Pelletier J. Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1-binding protein. *Arthritis & Rheum.* 1994;37:253-263.
44. Schouten JS, Van Den Ouweland FA, Valkenburg HA, Lamberts SW. Insulin-like growth factor-1: a prognostic factor of knee osteoarthritis. *Br. J. Rheum.* 1993;32:274-280.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of IGF-1 treatment on uPA and PAI-1 production by normal and OA human primary osteoblasts. Confluent cells were incubated for the last 48 hours of culture in HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium in the presence or absence of 50 ng/ml IGF-1. uPA and PAI-1 levels in conditioned media were then detected by specific ELISA, and results are presented as the mean \pm SEM of 5 separate experiments for both normal and OA individuals.

Figure 2: Dose-response curve of basal uPA activity measured using a selective substrate (DL-Val-Leu-Arg-pNA) in response to IGF-1 treatment. Confluent normal and OA osteoblasts were incubated for the last 48 hours of culture with HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium in the presence of increasing doses of IGF-1 (1 to 50 ng/ml) in the presence or absence of IGF-1 receptor antibody. At the end of the incubation, the culture medium was collected and uPA activity determined after an incubation of 24 hours with the substrate. Results are the mean \pm SEM of 4 separate experiments for both normal and OA individuals.

Figure 3: Time-response curve of the effect of IGF-1 on basal uPA activity by OA osteoblasts. Confluent osteoblasts were incubated for the last 48 hours of culture with HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium, and in the presence of IGF-1 (50 ng/ml) for either 48, 24 or 6 hours or in the absence of IGF-1. At the end of the incubation, the culture medium was collected and uPA activity determined after 24 hours of incubation with a specific substrate. Results are the mean \pm SEM of 3 separate experiments from OA patients.

Figure 4: Selective inhibition of basal uPA activity by protease inhibitors. Confluent normal and OA osteoblasts were incubated with IGF-1 (50 ng/ml) for the last 48 hours of culture in HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium. At the end of the

incubation, the culture medium was collected and uPA activity determined with a selective substrate in the presence or absence of PAI-1 (4 mM), α_2 -antiplasmin (2 ug/ml), Leupeptin (0.5 ug/ml) or Aprotinin (2 ug/ml). Results are the mean \pm SEM of 4 separate experiments for both normal and OA individuals. Statistical differences are given for each inhibitor vs their respective Total.

Figure 5: Comparison of PAI-1-dependent basal and plasminogen-stimulated uPA activity in confluent normal and OA osteoblasts. Confluent normal and OA osteoblasts were incubated for the last 48 hours of culture with HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium in the presence or absence of 50 ng/ml IGF-1. At the end of the incubation the supernatant was collected and uPA activity was determined following an incubation of 24 hours in the presence or absence of plasminogen (100 μ g/ml) and of PAI-1 (4 mM). Results are the mean \pm SEM of 4 (normal) and 5 (OA) individual experiments.

Figure 6: Dose-response curve of plasminogen-stimulated uPA activity measured using a selective substrate in response to IGF-1 treatment. Confluent normal and OA osteoblasts were incubated for the last 48 hours of culture with HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium in the presence of increasing doses of IGF-1 (1 to 50 ng/ml) in the presence or absence of IGF-1 receptor antibody. At the end of the incubation, the culture medium was collected and uPA activity determined with a selective substrate. Results are the mean \pm SEM of 5 separate experiments from normal and OA individuals.

Figure 7: Representative zymograph of plasminogen activator from normal and OA osteoblasts. Confluent normal and OA osteoblasts were incubated for the last 48 hours of culture with HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium in the presence or absence of 50 ng/ml IGF-1. Culture media were collected, and aliquots corresponding to culture media conditioned from 25 μ g of cell proteins were applied to electrophoresis in gels containing

plasminogen and casein. Upon plasminogen hydrolysis by uPA, plasmin degrades casein included in the gel which is visualized as a clear band after Coomassie blue staining.

Figure 8: Direct determination of plasmin activity in normal and OA culture medium. Confluent normal and OA osteoblasts were incubated for the last 48 hours of culture with HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium in the presence or absence of 50 ng/ml IGF-1. Plasmin was determined using a selective substrate, and samples were incubated in the presence or absence of plasminogen (100 $\mu\text{g/ml}$). Results are the mean \pm SEM of 3 normal and OA experiments.

Figure 1: Hilal, Martel-Pelletier, Pelletier, Duval & Lajeunesse

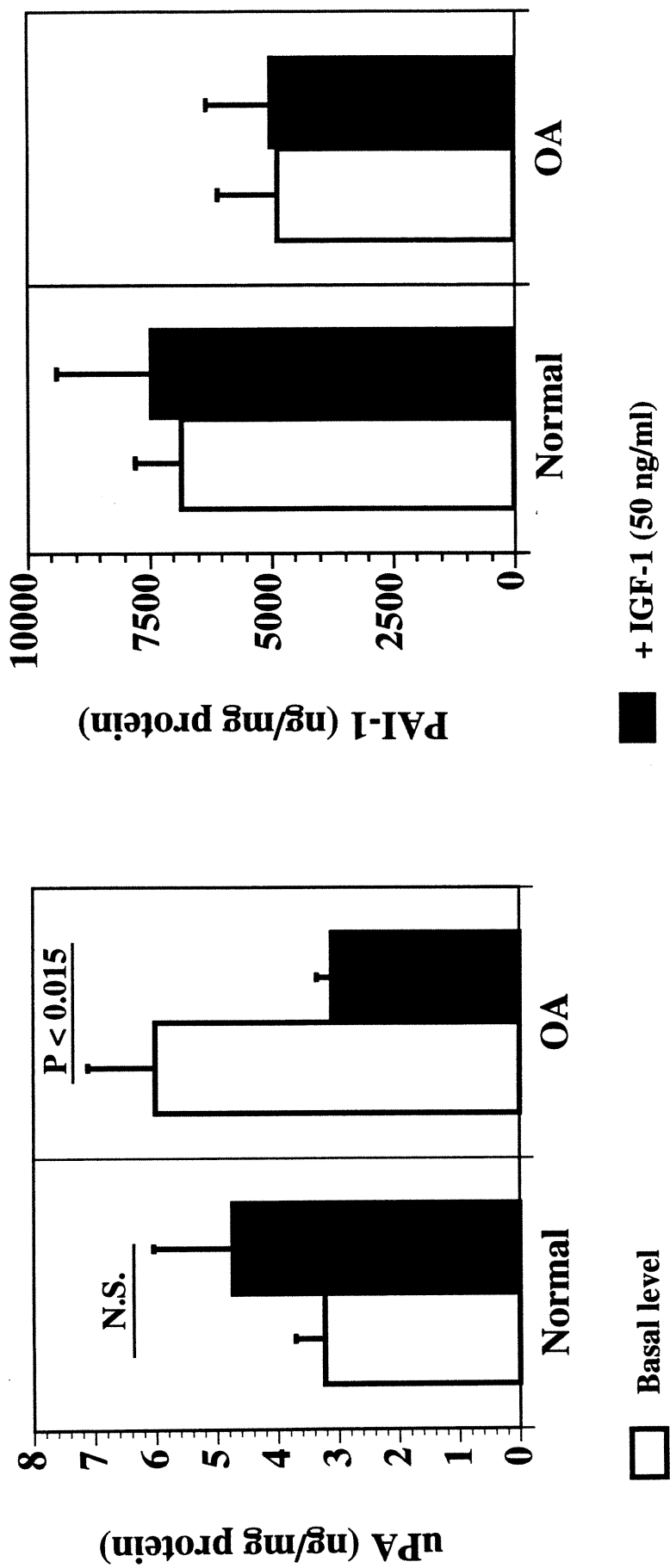


Figure 2: Hilal, Martel-Pelletier, Pelletier, Duval & Lajeunesse

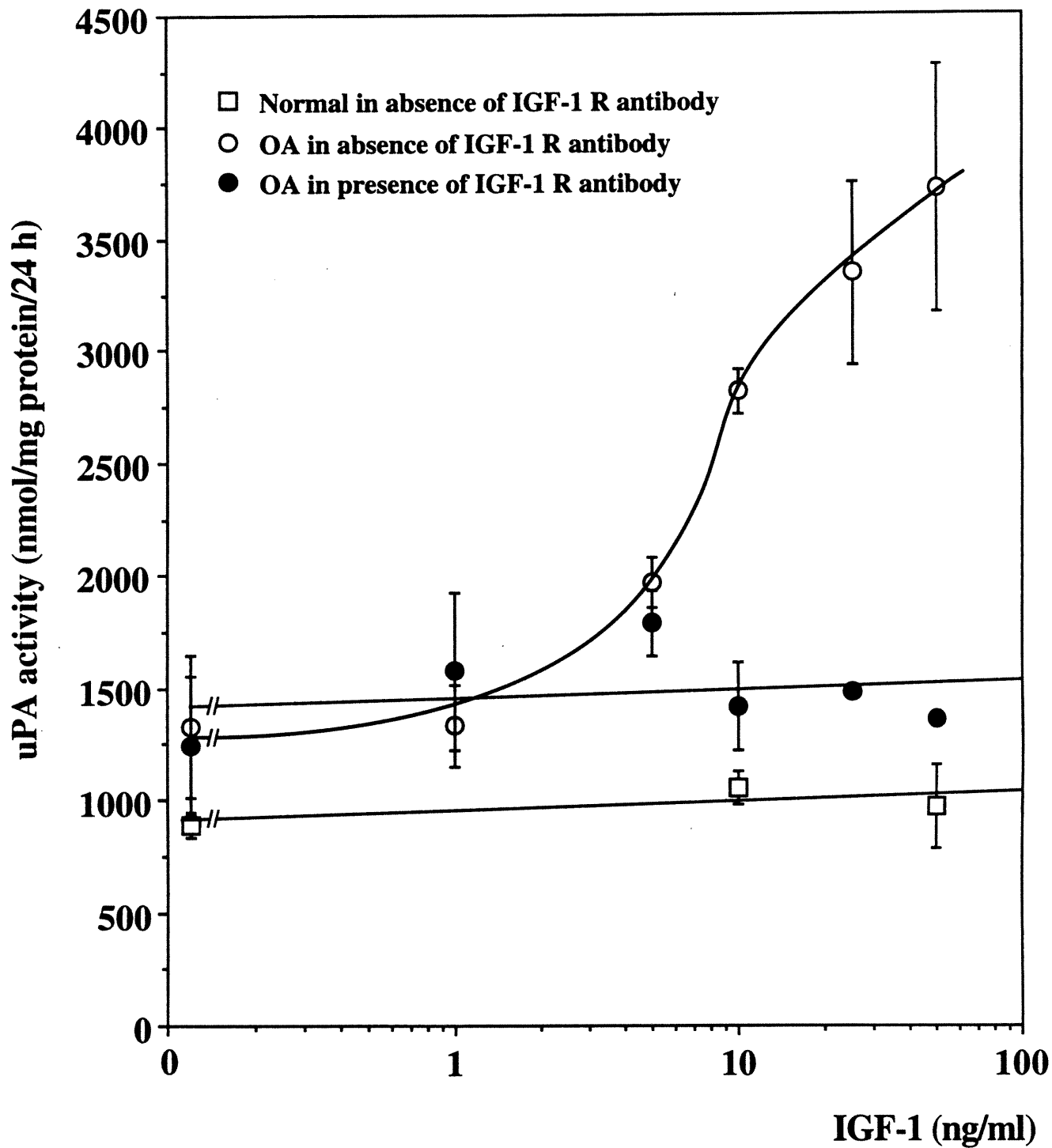


Figure 3: Hilal, Martel-Pelletier, Pelletier, Duval & Lajeunesse

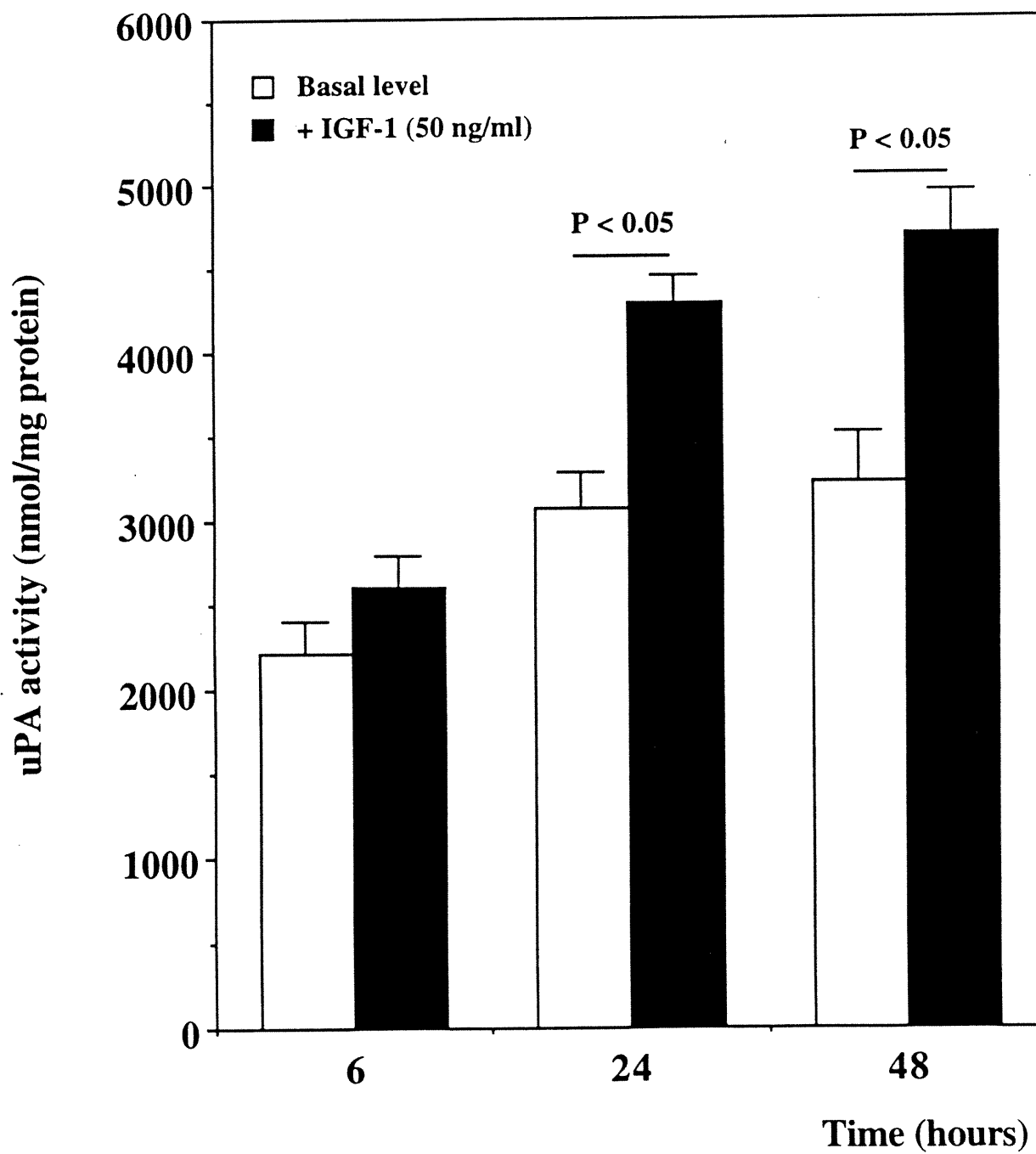


Figure 4: Hilal, Martel-Pelletier, Pelletier, Duval & Lajeunesse

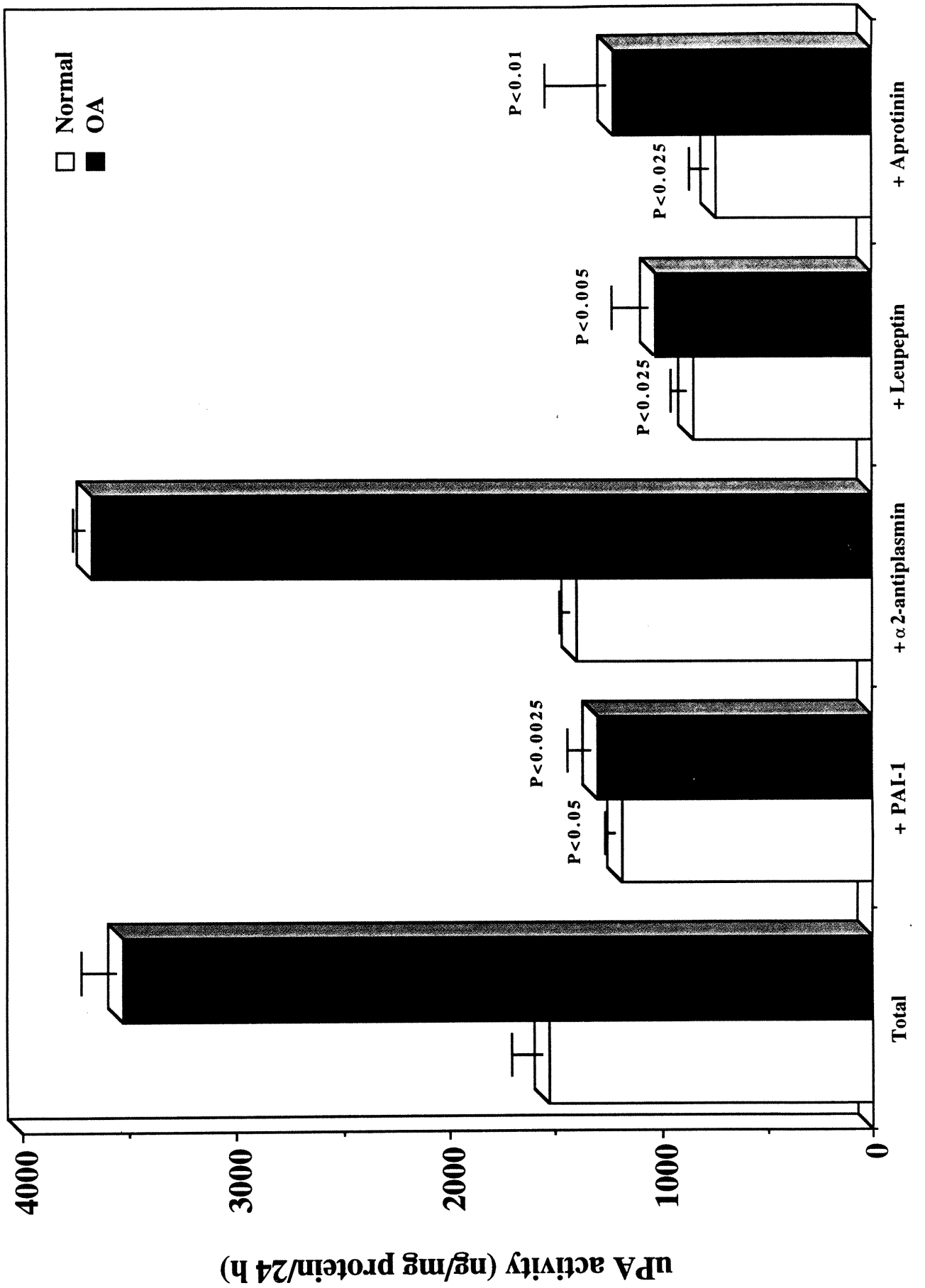


Figure 5: Hilal, Martel-Pelletier, Pelletier, Duval & Lajeunesse

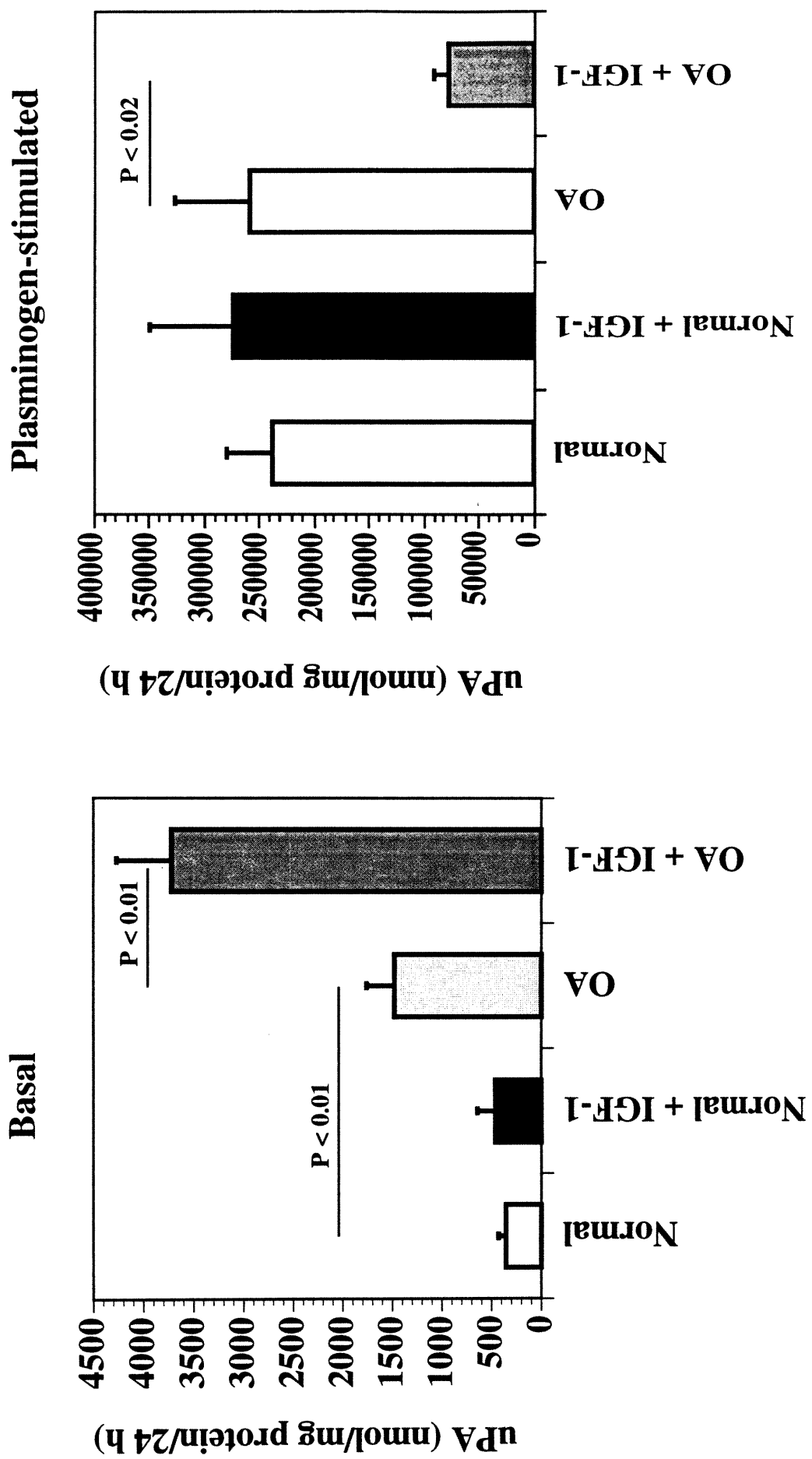


Figure 6: Hilal, Martel-Pelletier, Pelletier, Duval & Lajeunesse

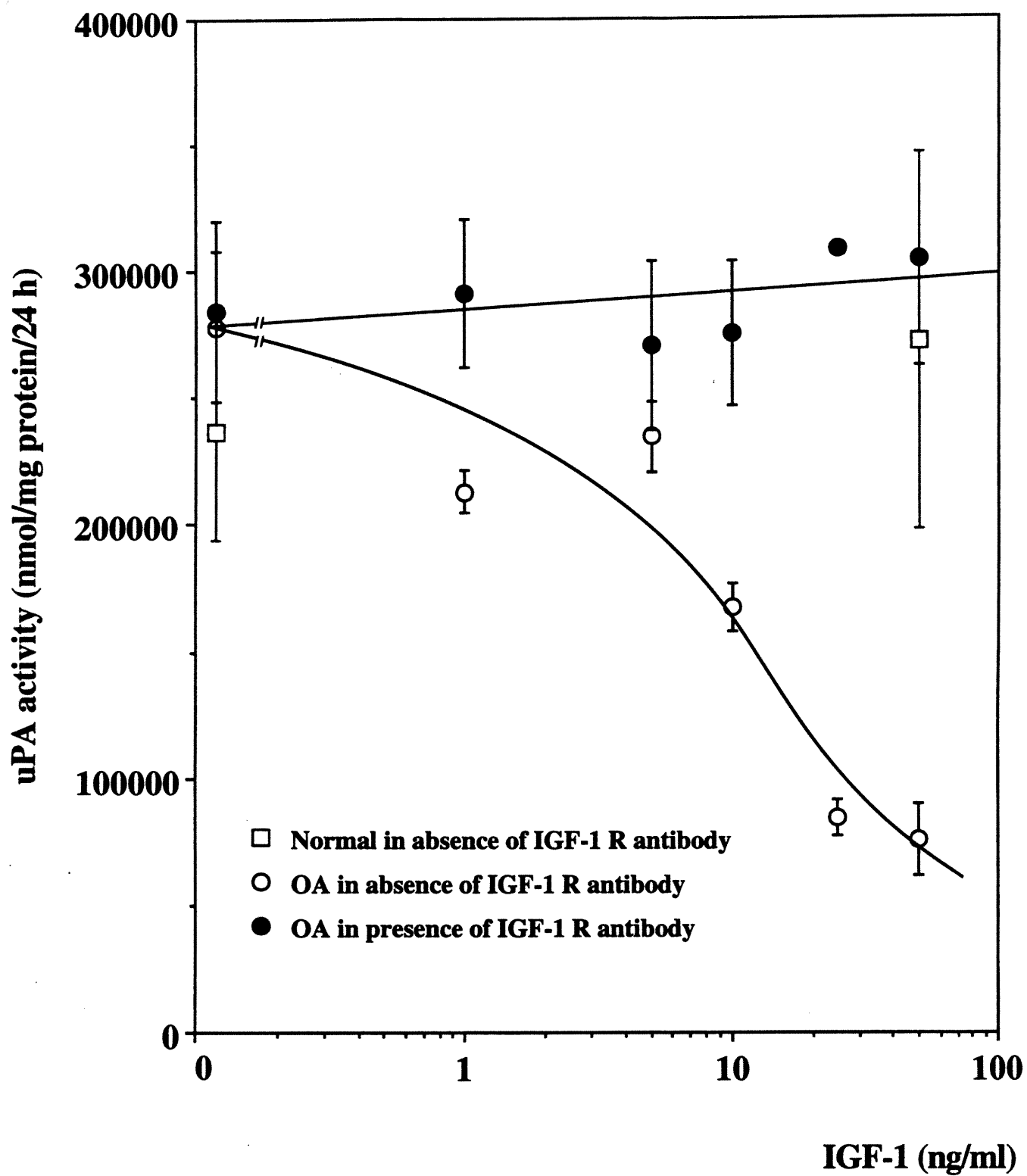


Figure 7: Hilal, Martel-Pelletier, Pelletier, Duval & Lajeunesse

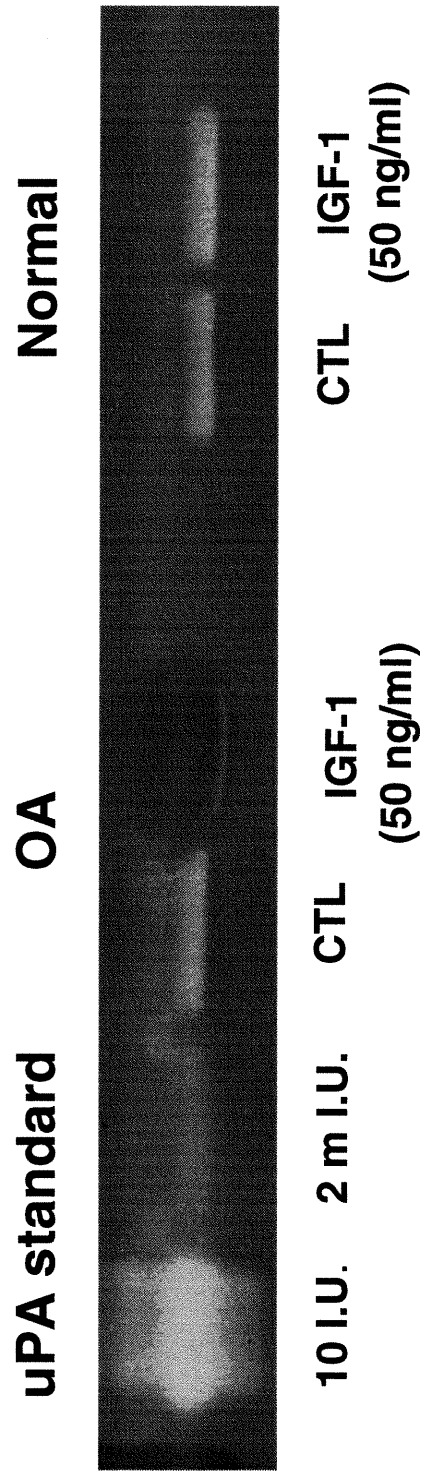
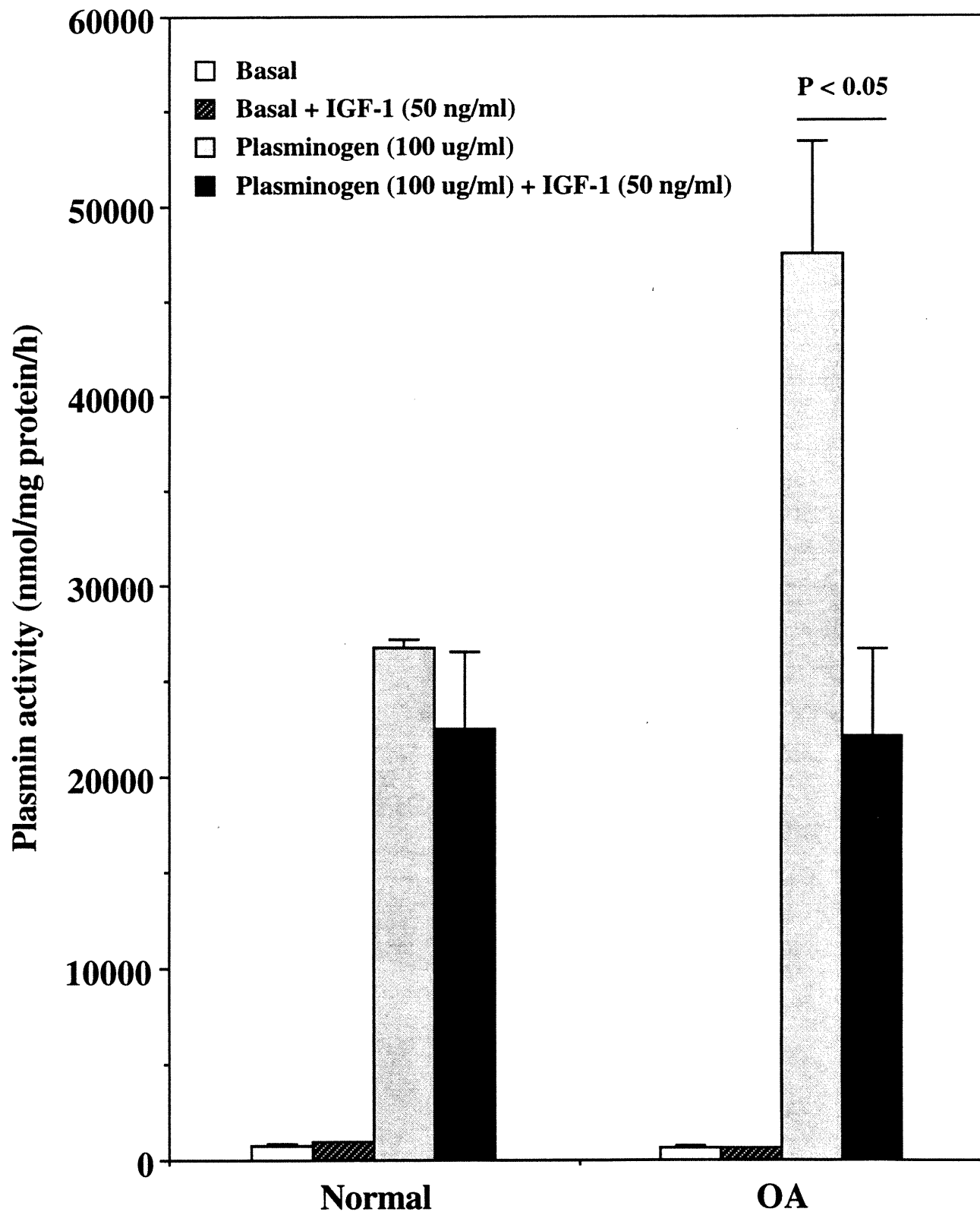


Figure 8: Hilal, Martel-Pelletier, Pelletier, Duval & Lajeunesse



Abnormal expression of parathyroid hormone (PTH) receptor in human osteoarthritic osteoblasts may explain altered response to PTH challenge.

(This article is submitted to the Journal of Clinical Investigation)

George Hilal, Daniel Lajeunesse, Jean-Pierre Pelletier, Nicolas Duval & Johanne Martel-Pelletier*.

Rheumatology research unit, Centre de recherche, Hôpital Notre-Dame du CHUM, Montréal, Québec, Canada.

running title: Altered response to PTH in osteoarthritic osteoblasts is due to reduced PTH receptor levels.

* corresponding author: Johanne Martel-Pelletier
 Unité de recherche en Arthrose
 Centre de recherche
 Hôpital Notre-Dame du CHUM
 1560, rue Sherbrooke Est
 Montréal (Québec) CANADA
 H2L 4M1

Phone: (514) 281-6000 ext.7281

FAX: (514) 896-4680

Abstract

Increasing evidence indicate that the bone compartment may be important for the onset and/or progression of cartilage loss/damage in human osteoarthritis (OA). Human OA osteoblasts (Ob) show an abnormal phenotype *in vitro* that could be linked to altered bone remodeling *in vivo*. In particular, OA Ob show reduced cAMP synthesis in response to parathyroid hormone (PTH) challenge. Here we investigated the molecular mechanism responsible for reduced PTH-dependent cAMP synthesis in these cells compared to normal human osteoblasts. OA Ob produced 50% less cAMP in response PTH, an effect not related to an inhibition of adenylate cyclase activity as forskolin treatments, which bypass receptor modulation, produced similar responses in normal and OA Ob. The ribosylation of stimulatory G proteins (Gs) and inhibitory G proteins (Gi) were tested using Cholera toxin (Gs) and Pertussis toxin (Gi) which should increase or decrease respectively PTH-dependent cAMP synthesis. Cholera toxin failed to significantly increase PTH-dependent cAMP whereas Pertussis toxin completely inhibited cAMP formation, indicating that Gs protein signalling is blunted but not the Gi pathway in OA cells. However, the failure to stimulate PTH-dependent cAMP synthesis with Cholera toxin could not be attributed to diminished level of stimulatory G proteins as Western blot analysis of Gs proteins showed similar levels for normal and OA Ob. Binding of ^{125}I -PTH to OA Ob was reduced by about $50.5 \pm 9.5\%$ ($n=5$) compared to normal cells, indicating a decrease in PTH receptor abundance in OA osteoblasts. Semi-quantitative RT-PCR analysis of the PTH receptor in normal and OA cells further showed a decrease of PTH receptor to glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) ratio of about 25 to 65 % ($47.3 \pm 11.8\%$, $n=3$) in OA compared to normal osteoblasts according to disease severity, indicating a decrease in PTH receptor mRNA expression in OA cells. OA osteoblasts produced more PGE_2 than normal Ob, a situation that may lead to heterologous desensitization. Indeed, Naproxen reduced PGE_2 production about 50% in OA Ob and increased PTH-dependent cAMP formation by OA osteoblasts to similar levels as obtained in normal Ob. Heterologous desensitization can explain a decrease in PTH binding but may not fully account for reduced PTH receptor expression. However, blocking Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 signalling with

selective IGF-1 receptor inactivating antibodies increased ^{125}I -PTH binding in OA Ob to levels still slightly less than in normal Ob without antibodies. These results suggest that the altered response to PTH in OA osteoblasts may be due to: i) abnormally low levels of PTH receptors in these cells possibly via IGF-1 signalling, ii) reduction in receptor abundance due to heterologous desensitization and; iii) reduced intracellular signalling via the Gs pathway. Since PTH regulates bone remodeling via its action on osteoblasts, the reduction in PTH receptor and hormonal signalling could contribute to abnormal bone remodeling and bone sclerosis in osteoarthritis.

Key words: Human primary osteoblasts, osteoarthritis, PTH receptor, G protein ribosylation, PTH binding

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a leading cause of morbidity and mortality in the ageing population, and it is a chronic disorder of the skeleton involving deterioration of both cartilage tissue and bone. This disease has a strong genetic component as demonstrated by family and twin studies. Although numerous studies have focused on a role of chondrocytes to explain the deterioration and loss of cartilage, recent data now indicate a possible role of bone in either the onset and/or progression of the disease (1-7). Indeed, abnormal bone mineral density, osteoid volume, bone mechanical parameters or indicators of bone turnover have been described in osteoarthritic patients as compared to normal individuals or osteoporotic patients. Moreover, patients with radiographic OA of the knee are associated with specific vitamin D receptor (8) and collagen type I genotypes (9).

These alterations in OA bone may be due to altered bone collagen production and/or deterioration, non-collagenous protein production, alkaline phosphatase activity and osteoblast phenotype (1-4). Recent evidence indicate that indeed, cocultures of OA osteoblasts with normal cartilage explants may initiate cartilage degradation hence suggesting that OA osteoblasts may be responsible for the initiation of OA (7). Our own results have indicated abnormal phenotypic behavior of human OA osteoblasts in vitro (1) coupled with abnormal IGF-1 and uPA system signalling (2). Abnormal collagen production or content may be related to altered collagen synthesis by osteoblasts or reduced degradation (4). It is noteworthy that parathyroid hormone (PTH) can regulate collagen production, collagen breakdown via collagenase production, and IGF-1 and IGF binding proteins (IGFBP) synthesis (10-12). As these pathways are regulated by protein kinase A (PKA), the observation that cAMP formation by OA osteoblasts is partially resistant to PTH- and totally resistant to prostaglandin E₂ (PGE₂) stimulation (1) could suggest that the PKA pathway is inhibited in these cells, and that downstream signals are also altered such as collagen formation, collagenase production and IGF-1 synthesis. Alternatively, it could also indicate abnormal PTH receptor activity and/or abundance as this would also lead to a decreased

production of cAMP. Since bone remodeling involves a tight coupling between bone resorption and bone formation, abnormal PTH signalling may lead to an imbalance in bone remodeling favoring bone formation.

PTH can activate different intracellular signal transduction pathways in osteoblasts (13-18). PTH can stimulate cAMP formation and PKA (13,14), it can activate the calcium/protein kinase C pathway via Inositol triphosphate (IP3) generation (15,16), and it can raise the intracellular calcium concentration via calcium influx through calcium channels (17-18). The activation of these second messengers can then lead to changes in specific gene expression. However, the cAMP-PKA pathway is thought to be the most important in osteoblastic cells (14,19). The stimulation of cAMP formation involves guanine nucleotide binding proteins (G proteins) that couple the receptors to the catalytic unit. Both stimulatory (Gs) and inhibitory (Gi) G proteins are present in most cells that respond to PTH. ADP ribosylation of G proteins by either Cholera toxin (Gs) or Pertussis toxin (Gi) can sensitize the cAMP response to PTH, whereas desensitization of cells due to prolonged exposure to PTH (autologous) or another agonist (heterologous) can also be observed (13,20-22). Hence, agonist-dependent cAMP formation can be modulated at different sites via specific mechanisms.

In this study, we investigated the PTH-dependent signalling pathway in human OA osteoblasts to determine what is the mechanism responsible for the diminished response to this agonist. Our results indicate that although these cells possess normal adenylate cyclase activity, they fail to produce normal levels of cAMP compared to normal cells. This is not due to abnormal levels of Gs proteins, but may be related in part to abnormal Gs proteins but not Gi proteins ribosylation. Abnormal PGE₂ production by these cells may reduce PTH-dependent cAMP formation. In addition, these cells show reduced binding of ¹²⁵I-PTH and reduced expression of PTH receptor mRNA. This indicates that receptor expression in OA osteoblasts may be

responsible for altered cell signalling, and could possibly explain abnormal bone remodeling in OA bone leading to bone sclerosis.

Material and Methods

Patients and clinical parameters.

OA patients were undergoing total knee replacement surgery, and tibial plateaus were recuperated under sterile conditions. Fourteen patients aged between 55 to 81 years old (69 ± 10 years; 6 males, 8 females) were classified as OA patients according to recognized clinical criteria (23). No patients had received medication that would interfere with bone metabolism, including corticosteroids, for 6 months prior to surgery, nor did they receive non-steroidal anti-inflammatory drugs within the last week prior to surgery. Specimens were obtained within 6 hours following surgery, and preparation of cell culture was performed within 6 hours post-op. Normal bone specimens ($n=7$) from tibial plateaus were collected at autopsy from individuals aged from 47 to 83 (68 ± 13 years; 4 males, 3 female). These were used following the establishment that they were not on any medication that could interfere with bone metabolism or had any bone metabolic disease. Individuals showing cartilage deterioration were not included in the normal group.

Preparation of primary bone cell cultures.

The overlaying cartilage was first removed from tibial plateaus, and the trabecular bone tissue was dissected away from the cortical subchondral bone plate. Only medial tibial plateaus were dissected out to prepare explants and primary bone cell cultures. All manipulations were performed under a magnifying microscope to insure complete removal of cartilage and trabecular bone. The subchondral bone specimens from normal individuals was always thinner than that from OA patients which showed evident sclerosis (not shown).

Primary cell cultures were prepared as previously described (2,24,25) with minor modifications. Briefly, bone samples were cut into small pieces of 2 mm^2 prior to their sequential digestion in the presence of 1 mg/ml collagenase type I (Sigma) in HAMF12/DMEM media (Sigma) without serum at 37°C for 20, 20 and 240 minutes. This removes adhering cells and remaining bone marrow cells from the cortical bone pieces. After being washed with the same media, the

digested bone pieces were cultured in BGJ_b media containing 20% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker). This medium was replaced every 2 days until cells were observed in the petri dishes. At this point, the culture medium was replaced with fresh media containing 10% FBS. At confluence, cells were passaged once at a ratio 25,000 cells/cm² and grown in 25 cm² flasks for 5 days before assays. We have previously demonstrated that cells obtained under these culture conditions show an osteoblast-like cell phenotype (24,25). Cells were then used for cAMP assays as described below.

In some assays, cells were preincubated for the last 2 days in HAMF12/DMEM media containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium mixture (ITS, Sigma, St-Louis, MO) either alone or in the presence of 90 µM Naproxen to inhibit PGE₂ synthesis. Media was then collected at the end of the incubation and frozen at -80°C prior to PGE₂ assays. PGE₂ levels were determined by a selective EIA (Cayman, Ann Arbor, MI). Cells were then used for cAMP determination in response to PTH challenge as described below or washed twice with phosphate buffered saline pH 7.4, and solubilized in alkaline phosphatase buffer (ALPase buffer: 100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 1% Triton X-100, pH 10.5) for 60 minutes with agitation at 4°C prior to protein determination by the Bisinchoninic acid (BCA) method (26). In another set of assays, OA osteoblasts were preincubated for 30 minutes with or without an IGF-1 receptor (IGF-1R) antibody (1 µg/ml: Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) that inhibits IGF-1 signalling prior to conditioning as described above for 48 hours with the continuous presence of the IGF-1R antibody or they were incubated without IGF-1R antibody in HAMF12/DMEM media with 1% ITS. These cells were then used for ¹²⁵I-PTH binding experiments as described below.

Cyclic AMP formation in response to parathyroid hormone stimulation.

Prior to hormonal challenge, osteoblasts were incubated overnight in Ham's F12/DMEM media containing 1% ITS. In some assays, Naproxen (90 µg/ml), an inhibitor of PGE₂ production, was incubated in the presence of the cells for the last 24 hours of culture. Likewise,

the ribosylation of Gs and Gi proteins was performed using Cholera toxin (1 ug/ml; CT) or Pertussis toxin (50 ug/ml; PT) respectively which were added in the culture media 24 hours prior to stimulation with PTH. For cAMP determination, cells were preincubated for 10 min in the presence of a phosphodiesterase inhibitor (1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma), in HAM's F12/DMEM media containing 0.5% bovine serum albumin (fatty acid free fraction V, Sigma). At the end of the preincubation, cells were incubated for 5 min in the same media, containing 100 nM human parathyroid hormone fragment 1-34 (PTH; Peninsula, Belmont, CA), 1 μ M Forskolin (Sigma) or the vehicle, and the reaction was stopped by 3% perchloric acid (final concentration). Cyclic AMP levels were then evaluated by radioimmunoassay (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) as previously described (25,27).

Binding of 125 I-PTH to human osteoblasts.

Following preincubation for 48 hours with or without IGF-1 receptor antibodies, normal and OA osteoblasts at 80 to 90% confluence in 12 wells plates were washed three times with cold PBS pH 7.4 prior to incubation with 1×10^6 cpm 125 I Nor-Leu 1-34 PTH at a final concentration of 1 pM, in the presence (non-specific binding) or absence (total binding) of a 1 μ M of unlabeled human PTH fragment 1-34 to determine specific binding as previously described by Kawane and Horiuchi (28). Cells were incubated for 3 hours at room temperature followed by three washings with cold PBS at pH 7.4. Cells were then solubilized in 2% sodium dodecyl sulfate, and aliquots counted directly in a beta counter after solubilization in a scintillation cocktail. Specific binding was assessed as the difference between total minus non-specific binding. Proteins were also determined as described above for each individual assays.

Semi quantitative RT-PCR of the PTH receptor.

Normal and OA osteoblasts at 80 to 90% confluence in T25 flasks were treated for the last 24 hours of culture with Ham's F12/DMEM media containing 1% ITS. At the end of the incubation, cells were washed twice with PBS and scraped into Trizol lysing solution (Gibco BRL,

Burlington, Ontario, Canada). Total RNA was extracted by the method of Chomczynski and Sacchi (29). Twelve μg of mRNA per individual cells were used for RT-PCR amplification. Total RNA was denatured by heating to 75°C for 3 minutes, and first-strand cDNA synthesis was performed by RT for 15 minutes at 42°C in $40\ \mu\text{l}$ reaction volume. A 500 base pairs cDNA probe for the PTH receptor was generated via PCR based amplification in $50\ \mu\text{l}$ reaction under $50\ \mu\text{l}$ of mineral oil with normal and OA samples using 25 pmol of each primers (sense) 5'-AGTACCGGAAGCTGCTCAAA-3' and (antisense) 5'-CACTCTTCCTGTAGCAGGGC-3'. Amplification (twenty cycles, linear portion) was performed using these primers to amplify the PTH receptor, and for the detection of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH), using 25 pmol of primers (sense) 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' and (antisense) 5'-GCTTGACAAAGTGGTGGTTGA-3' as an internal standard to quantitate PTH receptor mRNA abundance between normal and OA osteoblasts.

Western blot analysis of G proteins.

Confluent normal and OA osteoblasts in T25 flasks were washed twice with PBS and scraped into the same buffer as used for alkaline phosphatase determinations. The cell suspension was then diluted in 2x electrophoresis buffer made of 8% sodium-dodecyl sulfate, 24% glycerol, 100 mM Trizma base pH 6.8, 4% β -mercaptoethanol and 0.02% bromophenol blue. SDS-Page electrophoresis was performed in 10% acrylamide gel for 150 minutes at 100 volts. Following SDS-Page, proteins were electrotransferred for 75 min at 100 mA (constant current) in a semi-dry electroblot apparatus on Nitrocellulose. Western blots were then performed in the presence of a polyclonal rabbit anti-Gs α subunit (Calbiochem, La Jolla, California, U.S.A.) at a final dilution of 1:1000. This antibody was then detected by horseradish peroxidase-coupled sheep anti-rabbit IgGs (dilution 1:5000), and the protein bands detected by ECL-plus chemiluminescence kit with LumigenTM-PS3 (Amersham Pharmacia biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Specific bands were then visualized using Kodak X-Omat films, and scanning densitometry was performed directly on these films.

Statistics.

Results are expressed as the mean \pm SEM of n separate cultures from normal or OA preparations. Assays were performed in triplicate for cell cultures, except where indicated. Statistical analysis was performed by the two-tailed Mann-Whitney test, and a difference of 0.05 was considered significant.

Results

Production of cAMP by normal and OA osteoblasts in response to PTH

Normal and OA osteoblasts both responded to PTH challenge with an increase in cAMP formation, however OA cells produced about 50% less cAMP than normal cells (Table 1). As the response to PTH was blunted in OA osteoblasts, this can be due to either abnormal adenylate cyclase activity, receptor coupling (G protein coupling), receptor abundance or expression. We first tested whether adenylate cyclase activity was perturbed by stimulating cells with 1 μ M forskolin which bypasses receptor mediated coupling. As can be noted in Table 1, forskolin stimulated cAMP formation to similar levels in normal and OA osteoblasts indicating that this enzyme pathway is still functional in OA cells. As this last result indicates normal adenylate cyclase activity, this also suggested that PTH signalling was altered in these cells. We therefore investigated the response of OA osteoblasts to Cholera toxin (Gs) and Pertussis toxin (Gi) which should enhance and inhibit respectively PTH-stimulated production of cAMP if G protein function and coupling is intact in these cells. Treatments with specific toxins showed contrasting effects. Indeed, as shown in Figure 1, PTH-dependent cAMP formation by OA osteoblasts pre-incubated with Cholera toxin was not significantly different from PTH treatment alone, suggesting that their ribosylation is inhibited. In contrast, PTH-dependent cAMP formation was curbed by Pertussis toxin pretreatment (Figure 1), indicating that the inhibitory Gi pathway is intact in OA osteoblasts. Second, Western blot analyses indicated that the levels of Gs proteins are similar in normal and OA osteoblasts (Figure 2). Taken together, the ribosylation experiments and the Western blot analyses indicate that the G protein signalling pathways are abnormal in these cells, with a possible enhancement of the inhibitory signal over the stimulatory signal.

Abundance of PTH receptor protein and quantification of mRNA in osteoblasts.

The second hypothesis that can explain abnormal PTH-dependent cAMP formation in OA osteoblasts is that PTH receptors are less numerous in these cells. We used two technical approach to determine the abundance of PTH receptors in OA osteoblasts vs normal cells. Using 125 I-PTH binding, a specific reduction of PTH receptor maximal binding was observed in OA osteoblasts

compared to normal cells (Figure 3). Indeed, a reduction of $50.5 \pm 9.5\%$ ($P < 0.02$ by Student's t-test) in receptor abundance was observed in OA osteoblasts. This could either be due to altered PTH receptor mRNA regulation or post-transcriptional modulation. Semi-quantitative RT-PCR of the PTH receptor mRNA along with GAPDH mRNA using selective oligonucleotide primers indicated a reduction in PTH receptor amplification from osteoblasts of moderate to severe OA cases, suggesting a reduction in mRNA levels in these cells (Figure 4). Densitometric analysis of PTH receptor to GAPDH ratio indicate a $47.3 \pm 11.3\%$ ($P < 0.02$) reduction in OA osteoblasts compared to normal osteoblasts. This indicates that PTH receptor gene expression is directly altered in OA osteoblasts, and that the reduction in PTH receptor abundance is probably not linked to post-transcriptional abnormalities.

Role of heterologous desensitization in reduced PTH response in OA osteoblasts.

Lastly, the inhibition of cAMP response to PTH challenge in OA osteoblasts may be due to either homologous (previous PTH challenge) or heterologous desensitization (challenge with another effector triggering cAMP production). As osteoblasts do not produce PTH but can produce PGE₂, the question arised whether *de novo* PGE₂ production by these cells could be elevated enough to inhibit their subsequent response to PTH challenge. Indeed, OA osteoblasts produced more PGE₂ than normal cells, and levels were about two fold higher in these cells versus normal osteoblasts (Figure 5, right). When we tried to inhibit PGE₂ synthesis with Naproxen in OA cells, PGE₂ levels were reduced by about 50% (Figure 5, right). Cyclic AMP formation in response to PTH in OA cells is reduced compared to normal cells (Figure 5, left), yet treatment with Naproxen reversed this inhibition of PTH-dependent cAMP formation. Taken together, this would suggest that *de novo* PGE₂ formation under the present culture conditions reached levels high enough in OA cells to initiate heterologous desensitization of osteoblasts to PTH challenge.

Role of IGF-1 signalling in reduced PTH response in OA osteoblasts.

We previously showed that IGF-1 released by OA osteobalsts is several fold increased as compared to normal osteoblasts in *in vitro* cultures (1). As exogenous IGF-1 addition was recently

shown to inhibit PTH receptor mRNA expression in rat osteoblasts (28), we next tested if blocking IGF-1 signalling by the addition of inactivating antibodies to the IGF-1 receptor would increase PTH receptor abundance in OA osteoblasts. Incubating OA Ob for 48 hours with the IGF-1R antibodies increased about two fold PTH receptor abundance as evaluated by ¹²⁵I-PTH binding to OA Ob (Figure 6). These results indicate that IGF-1 signalling in OA Ob is responsible, at least in part, for the reduction in PTH receptor abundance possibly via a role on PTH receptor expression.

Discussion

Recent evidence indicate that bone, a major component of joint tissues, is involved in the pathophysiology of osteoarthritis (1-7). Indeed, clinical studies have indicated that OA patients have higher bone mineral density than normal individuals (30-34), whereas *in vitro* studies have shown abnormal collagen content and hypomineralization (3,4), and abnormal bone stiffness in these individuals (5,6). Alterations in bone collagen and mineralization can be linked to perturbed PTH signalling in these cells. PTH levels are generally within the upper normal limit (35), a situation that may indicate peripheral resistance to this hormonal challenge. We previously showed that OA osteoblasts have lower cAMP formation in response to PTH *in vitro* and no response to PGE₂ challenge (1). The present study indicates the pathways possibly involved in this resistance to PTH's action.

Coupling of PTH to cAMP generation in osteoblasts involves receptor signalling, G protein coupling and adenylate cyclase activation. Our data show no alteration in adenylate cyclase activity since stimulation of this enzyme with forskolin, a diterpene that can stimulate this enzyme directly, enhances cAMP formation to similar levels in normal and OA osteoblastic cells. Abnormal G protein coupling may explain, in part, the observed reduction in PTH-dependent cAMP formation in OA cells. This could not be due to abnormal levels of G_s proteins in OA cells as these were similar as in normal osteoblasts. However, regardless of G_s protein levels, Cholera toxin-dependent ADP ribosylation was abnormal in OA Ob since it failed to stimulate normally basal (not shown) and PTH-dependent cAMP formation (Figure 3). This is important as it could indicate abnormal stimulation of adenylate cyclase in these cells. This hypothesis is reinforced by the observation that G_i protein ADP-ribosylation was normal in OA Ob, indicating that the inhibitory G protein pathway is functional in these cells and may affect negatively cAMP formation. However, abnormal G_s protein signalling may also be linked to abnormal receptor coupling.

Three different approaches were used to assess PTH-receptor coupling in OA osteoblasts. We investigated receptor desensitization, binding characteristics and PTH receptor expression. Receptor desensitization can be observed in cells exposed over long periods of time to an effector, and both homologous (same effector for preincubation and stimulation) and heterologous (different effectors for preincubation and stimulation) desensitization can be encountered. Osteoblasts are known to produce PGE₂, however whether OA Ob produce more or less PGE₂ than normal Ob was unknown. Our data provide evidence that OA Ob produce about 2 to 3 times more PGE₂ than normal osteoblasts. High PGE₂ levels may be due to up-regulation of cyclo-oxygenase activity in these cells as also observed in OA synovial fibroblasts (36), a situation that could be related to prolonged mechanical stimulation of bone in these patients since it can promote prostaglandin synthesis in osteoblasts (37). This observation is crucial as PGE₂ is known to induce heterologous desensitization of the PTH receptor in osteoblastic cells (22). The inhibition of PGE₂ production by OA Ob with Naproxen reduced PGE₂ levels to normal in our assays, and this treatment also resulted in an increase in PTH-dependent cAMP formation in these cells. This suggests that heterologous desensitization or retarded PTH receptor recycling is involved, at least in part, in abnormal PTH response in OA Ob.

However, this could not be due to enhanced cAMP formation in response to elevated PGE₂ levels since we previously showed that OA Ob were refractory to PGE₂ stimulation (1). It is more likely that PGE₂-dependent inhibition of PTH receptor recycling was due to a direct action on Gi proteins. Indeed, as previously shown by Pines et al for chondroprogenitor cells (38), PGE₂-dependent heterologous desensitization to PTH challenge was independent of cAMP formation as forskolin was still effective in these cells as in our previous study (1) but was related to pertussis toxin-sensitive G proteins (Gi). As we showed that pertussis toxin-dependent ribosylation was still functioning in OA Ob, this could explain, at least in part, the observed reduction in PTH recycling. The high levels of PGE₂ produced by OA Ob may also explain the observed reduction in subsequent PGE₂-induced cAMP formation by these cells, which was totally abrogated, via

homologous desensitization. Moreover, the inhibition of PTH receptor recycling is also reinforced by the binding experiments which showed reduced ^{125}I -PTH binding in OA osteoblasts compared to normal osteoblasts. Indeed, if PGE_2 -dependent heterologous desensitization is present in OA Ob, it would lead to reduction in total PTH receptor abundance in these cells.

However, heterologous PTH receptor desensitization does not seem to be the only mechanism responsible for the reduction in PTH receptor abundance in OA osteoblasts. Indeed, semi-quantitative RT-PCR of PTH receptor mRNAs of normal and OA osteoblasts showed generalized reduction in PTH receptor mRNA in OA osteoblasts, however this reduction was highly variable. This variability could be accounted for by disease severity in these patients, yet we have to underline that all OA patients showed a reduction in PTH receptor mRNA levels regardless of disease severity. Hence, this would indicate that PTH receptor expression is altered in osteoarthritic osteoblasts, a situation that would lead to abnormal PTH-dependent signalling and possibly abnormal bone resorption in these individuals. This does not rule out however, that a number of mechanisms may be involved in altered PTH signalling such as reduced PTH receptor recycling and mRNA expression.

The reduction in PTH receptor expression in OA osteoblasts may also be linked to elevated PGE_2 production in these cells and IGF-1 signalling. Indeed, recent evidence indicate that IGF-1 can directly inhibit PTH receptor expression in rat osteoblasts (28). As we previously showed that IGF-1 levels in OA osteoblasts are increased compared to normal osteoblasts (1), this altered production could be responsible, at least in part, for the inhibition of PTH receptor expression. Moreover, recent data indicate that PGE_2 can directly affect IGF-1 production in rat osteoblasts (39), and hence elevated PGE_2 levels such as those observed in our OA osteoblasts may be sufficient to elicit this elevation in IGF-1 production. As IGF-1 release by OA Ob is elevated compared to normal Ob (1), this would suggest that under the present culture conditions OA Ob would have reduced PTH receptor levels which is the case here. Moreover, blocking IGF-1

signalling with selective IGF-1 receptor antibodies increased PTH receptor levels in OA Ob, albeit not to similar levels as in normal Ob. This indicates that IGF-1 release in OA Ob is sufficient to partly inhibit PTH receptor expression but that this mechanism can not fully explain the observed reduction in PTH receptor abundance in these pathologic cells. It is noteworthy that clinical data have shown that IGF-1 levels are associated with increased disease severity in OA patients and osteophyte growth (40) whereas we are showing that PTH receptor expression in *in vitro* OA osteoblasts is reduced with disease severity. Lastly, elevated IGF-1 levels are associated with perturbed urokinase plasminogen activator and plasmin activity in OA osteoblasts (2), a situation that can also lead to abnormal bone remodeling (41).

In conclusion, our data indicate that as disease severity in OA progresses, PTH receptor expression is reduced in osteoblasts. These cells also show reduced PTH binding indicating reduced PTH receptor abundance that may be linked to the altered PTH receptor expression and recycling via heterologous desensitization due to elevated PGE₂ levels. These altered mechanisms all lead to blunted PTH-dependent cAMP formation, a situation that may lead to abnormal gene expression and reduced bone resorption/remodeling in these patients. This situation, in turn, may be responsible for bone sclerosis observed in osteoarthritic patients.

ACKNOWLEDGEMENT

D. Lajeunesse is a Senior Scholar from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec". G. Hilal is a student grantee from the "Unité de Recherche en Arthrose, Centre de recherche L.C. Simard". We wish to thank Dr. Ginette Tardif for her expert advice for PCR experiments. This research was supported by The Arthritis Society of Canada grant # 505 and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec "Équipe Prioritaire".

References

1. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro. Possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis & Rheum.* 1998;41: 891-899.
2. Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Lajeunesse D. Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator Insulin-like growth factor-1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis & Rheum.* 1999; in press.
3. Mansell JP, Tarlton JF, Bailey AJ. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *British J. Rheumatology* 1997;36:16-19.
4. Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* 1998;101:1596-1603.
5. Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J. Bone Min. Res.* 1997;12:641-651.
6. Li B, Aspden RM. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Annals of the Rheum. Dis.* 1997;56:247-254.
7. Westacott CI, Webb GR, Warnock MG, Sims JV, Elson CJ. Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis & Rheum.* 1997;40:1282-1291.

8. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Odding E, van Duijn CM, Hofman A, Birkenhäger JA, van Leeuwen PTM, Pols HAP. Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J. Clin. Invest.* 1997;100:259-263.
9. Vikkula M, Palotie A, Ritvaniemi P, Ott J, Ala-Kokko L, Sievers U, Aho K, Peltonen L. Early-onset osteoarthritis linked to the type II procollagen gene. *Athritis & Rheum.* 1993;36:401-409.
10. Partridge NC, Dickson CA, Kopp K, Teitlebaum SL, Crouch EC, Kahn AJ. Parathyroid hormone inhibits collagen synthesis at both ribonucleic acid and protein levels in rat osteogenic sarcoma cells. *Mol. Endocrinol.* 1989;3:232-239.
11. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J. Clin. Invest.* 1989;83:60-65.
12. Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim. Biophys. Acta* 1984;802:151-154.
13. Fukayama S, Schipani E, Jüppner H, Lanske B, Kronenberg HM, Abou-Samra A-B, Bringhurst FR. Role of protein kinase-A in homologous down-regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* 1994;134:1851-1858.
14. Partridge NC, Bloch SR, Pearman AT. Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. *J. Cell Biochem.* 1994;55:321-327.

15. Dunlay R, Hruska K. PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney. *Am. J. Physiol.* 1990;258:F223-F231.
16. Cosman F, Morrow B, Kopal M, Bilezikian JP. Stimulation of inositol phosphate formation in ROS 17/2.8 cell membranes by guanine nucleotide, calcium and parathyroid hormone. *J. Bone Miner. Res.* 1989;4:413-420.
17. Civitelli R, Fujimori A, Bernier SM, Warlow PM, Goltzman D, Hruska KA, Avioli LV. Heterogeneous intracellular free calcium responses to parathyroid hormone correlate with morphology and receptor distribution in osteogenic sarcoma cells. *Endocrinology* 1992;130:2392-2400.
18. Yamaguchi DT, Hahn TJ, Iida-Klein A, Kleeman CR, Muallem S. Parathyroid hormone-activated calcium channels in an osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. *J. Biol. Chem.* 1987;262:771-7718.
19. Civitelli R, Hruska KA, Shen V, Avioli LV. Cyclic AMP-dependent and calcium dependent signals in parathyroid hormone function. *Exp. Gerontol.* 1990;25:223-231.
20. Fukayama S, Tashjian AH Jr, Gringhurst FR. Mechanisms of desensitization to parathyroid hormone in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* 1992;131:1757-1769.
21. Abou-Samra A-B, Zajac JD, Schiffer-Alberts D, Skurat RM, Kearns AK, Segre GV, Bringhurst FR. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent and cAMP-independent regulation of parathyroid hormone receptors in UMR 106-01 osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1991;129:2547-2554.

22. Mitchell J, Goltzman D. Mechanisms of homologous and heterologous regulation of parathyroid hormone receptors in the rat osteosarcoma cell line UMR-106. *Endocrinology* 1990;126:2650-2660.
23. Altman R, Asch E, Block D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, Howell D, Kaplan D, Koopman W, Longley S III, Mankin H, McShane DJ, Medsger T Jr., Meenan R, Mikkelsen W, Moskowitz R, Murphy W, Rothschild B, Segal M, Sokoloff L, Wolfe F. Development of criteria for classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-1049.
24. Lajeunesse D, Busque L, Ménard P, Brunette MG, Bonny Y. Demonstration of an osteoblast defect in two cases of human malignant osteopetrosis: Correction of the phenotype after bone marrow transplant. *J. Clin. Invest.* 1996;98:1835-1842.
25. Lajeunesse D, Kiebzak GM, Frondoza C, Sacktor B. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone and Mineral* 1991;14:237-250.
26. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 1985;150: 76-85.
27. Lajeunesse D. Effect of 17β -estradiol on the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone and Mineral* 1994; 24:1-16.
28. Kawane T, Horiuchi N. Insulin-like growth factor I suppresses parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor expression via a mitogen-activated protein kinase pathway in UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1999;140:871-879.

29. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-159.
30. Foss MVL, Byers PD. Bone density, osteoarthritis of the hip and fracture of the upper end of the femur. *Ann Rheum Dis* 1972;31:259-264.
31. Roh YS, Dequeker J, Muller JC. Bone mass is osteoarthritis, measured *in vivo* by photon absorption. *J. Bone Joint Surg* 1974;56A:587-591.
32. Carlsson A, Nillson BE, Westlin NE. Bone mass in primary coxarthrosis. *Acta Orthop Scand* 1979;50:187-189.
33. Moore RJ, Fazzalari NL, Manthey BA, Vernon-Roberts B. The relationship between head-neck-shaft angle, calcar width, articular cartilage thickness and bone volume in arthrosis of the hip. *Br J Rheumatol* 1994;33:432-436.
34. Hannan MT, Anderson JJ, Zhang Y, Levy D, Felson DT. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women. *Arthritis & Rheum* 1993;36:1671-1680.
35. Geusens P, Dequeker J, Bouillon R. Salmon calcitonin stimulates PTH (1-84) and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in osteoporosis and osteoarthritis. *In Osteoporosis*. Christiansen C and Overgaard K, editors. Copenhagen, Osteopress, ApS, 1990. p.368-369.
36. Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier J-P, Kiansa K, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J. Inhibition of tumor necrosis factor α -induced prostaglandin E₂ production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheum.* 1999;42:710-718.

37. Brighton CT, Fisher JR Jr, Levine SE, Corsetti JR, Reilly T, Landsman AS, Williams JL, Thibault LE. The biochemical pathway mediating the proliferative response of bone cells to a mechanical stimulus. *J. Bone Joint Surgery* 1996;78-A:1337-1347.
38. Pines M, Yosif B, Hurwitz S. Modulation of responsiveness of the adenylate cyclase system in avian chondroprogenitor cells by pertussis toxin, PTH, and PGE₂. *J. Bone Min. Res.* 1989;4:743-750.
39. Bichell DP, Rotwein P, McCarthy TL. Prostaglandin E₂ rapidly stimulates insulin-like growth factor I gene expression in primary rat osteoblast cultures: evidence for transcriptional control. *Endocrinology* 1993;133:1020-1028.
40. Schouten JS, Van Den Ouweland FA, Valkenburg HA, Lamberts SW. Insulin-like growth factor-1: a prognostic factor of knee osteoarthritis. *Br. J. Rheum.* 1993;32:274-280.
41. Daci E, Udagawa N, Martin TJ, Bouillon R, Carmeliet G. The role of the plasminogen system in bone resorption in vitro. *J. Bone Min. Res.* 1999;14:946-952.

Table 1: Cyclic AMP production in normal and OA osteoblasts in response to PTH, PGE₂ and Forskolin stimulation. Confluent cells were preincubated for 10 minutes in HAMF12/DMEM media containing 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine and 0.05% bovine serum, and then incubation with the appropriate effector or vehicle for another 5 minutes after which the reaction was stopped. Cyclic AMP was determined using a Kit from Diagnostics Corporation. Results are the mean \pm sem on n individuals per condition.

Cyclic AMP formation (pmol/mg protein/5 min)			
	Normal osteoblasts	OA osteoblasts	p value
	n = 5	n = 7	N vs OA
Control	177.0 \pm 33.6	217.9 \pm 18.6	N.S.
PTH 100 nM	680.1 \pm 26.3	435.1 \pm 37.5	P < 0.0025
PGE ₂ 5 nM	396.8 \pm 22.2	186.4 \pm 13.4	P < 0.0025
Forskolin 1 μ M	592.7 \pm 117.6	616.4 \pm 63.2	N.S.

PTH (OA) vs Forskolin (OA): P < 0.01

Figure legends

Figure 1: Effect of cholera toxin and pertussis toxin treatments on PTH-dependent cAMP formation by osteoarthritic osteoblasts. Confluent OA osteoblasts were incubated for their last 24 hours of culture with either cholera toxin (1 ug/ml), pertussis toxin (50 ug/ml) or the vehicle. Cells were then stimulated with 100 nM PTH for 5 minutes, and cAMP determined on cell lysates. Results are the mean \pm sem of 6 cell culture preparations with triplicate determinations per condition.

Figure 2: Representative Western blot analysis of Gs protein levels in normal and OA osteoblasts. Confluent osteoblasts in T25 flasks were solubilized in electrophoresis buffer, proteins separated by SDS-Page electrophoresis and specific bands detected by chemiluminescence following incubation with a specific polyclonal against the α s-subunit of G proteins. Results from two cell culture preparations from both normal and OA individuals are presented.

Figure 3: Abundance of PTH receptors in Normal and OA osteoblasts. When cells reached 80-90% confluence they were preincubated for 48 hours with HAMF12/DMEM media with 1% Insulin-Transferrin-Selenium mix. At the end of the incubation, cells were incubated with 125 I-PTH in the presence or absence of 1 uM unlabeled PTH. Maximal binding capacity of these cells was established by Schatchard analysis. Results are the mean \pm sem of 3 normal and 8 OA cell culture preparations.

Figure 4: Evaluation of PTH receptor mRNA abundance in normal and OA osteoblasts. Semi-quantitative RT-PCR with specific primers for the PTH receptor and GAPDH was performed with 10 ug total DNA from both normal (n = 2) and OA (n = 3) individuals. The results show a clear reduction in PTH receptor mRNA abundance in OA individuals that is related to disease severity as assessed by the macroscopic and microscopic examination of the initial material.

Figure 5: Production of PGE₂ by normal and OA osteoblasts and role of PGE₂ levels on PTH-dependent cAMP formation by these cells. Confluent osteoblasts were incubated for their last 48 hours of culture in HAMF12/DMEM media without serum containing 1% Insulin-Transferrin-Selenium mix, in the presence or absence of 90 µg/ml Naproxen. Culture supernatants were removed and used for PGE₂ determination, whereas cells were used of cAMP determination as described in Table 1. Results are the mean ± sem of 4 normal and 4 OA cell culture preparations.

Figure 6: Effect of IGF-1 signalling blockade on PTH receptors in OA osteoblasts. When OA Ob reached 80-90% confluence they were preincubated for 48 hours with HAMF12/DMEM media with 1% Insulin-Transferrin-Selenium mix containing or not IGF-1 receptor antibodies. At the end of the incubation, cells were incubated with ¹²⁵I-PTH in the presence or absence of 1 uM unlabeled PTH. Maximal binding capacity of these cells was establish by Schatchard analysis. Results are the mean ± sem of 3 OA cell culture preparations.

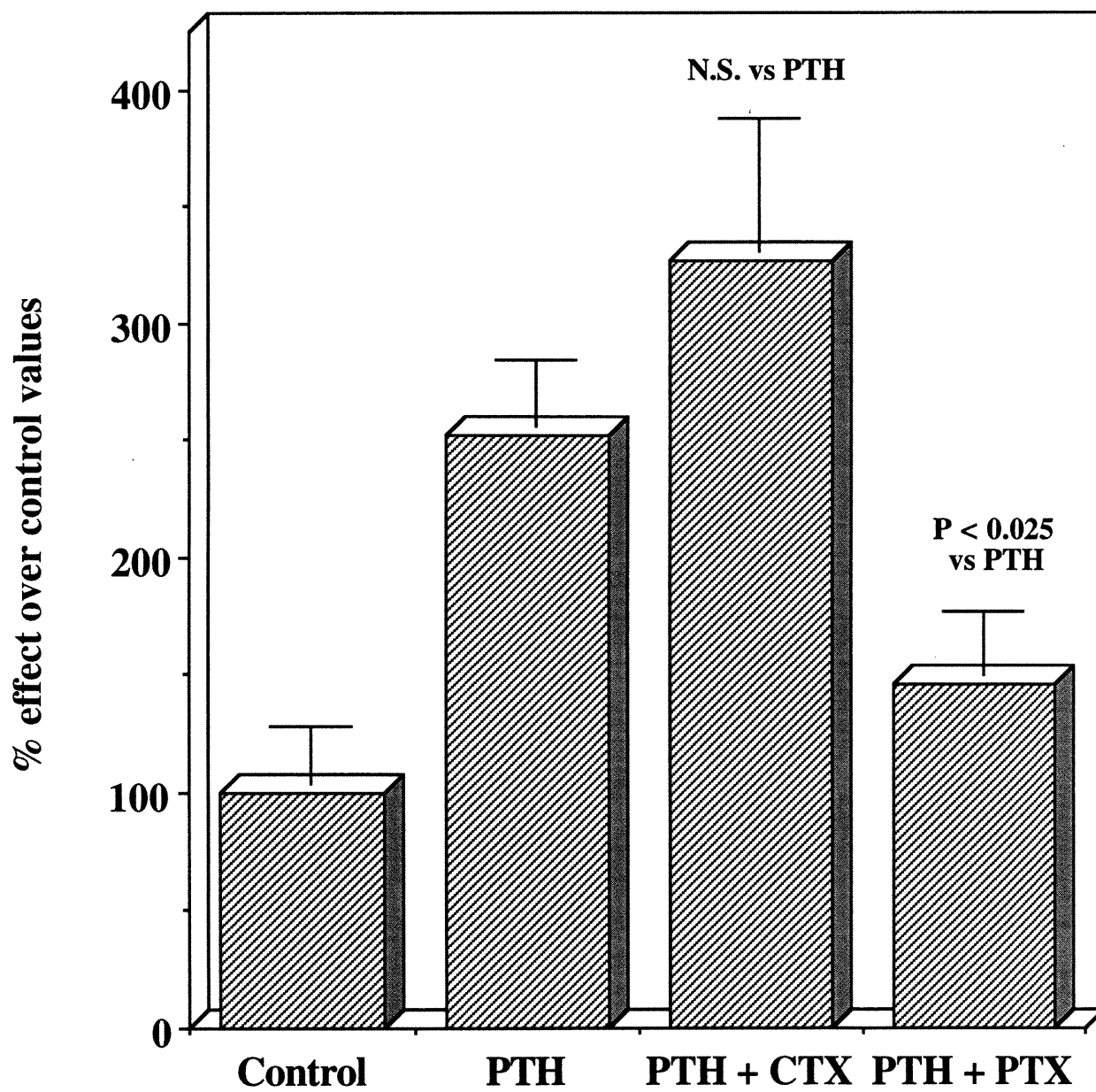


Figure 1

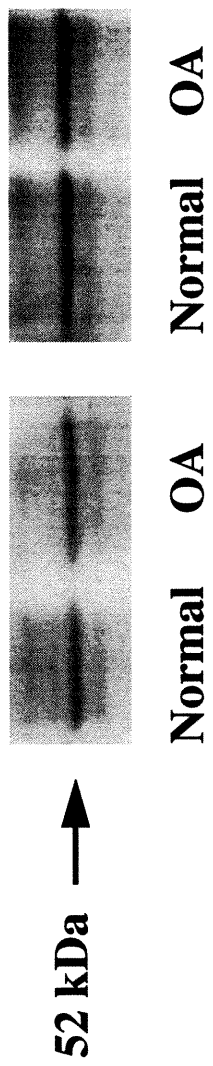


Figure 2

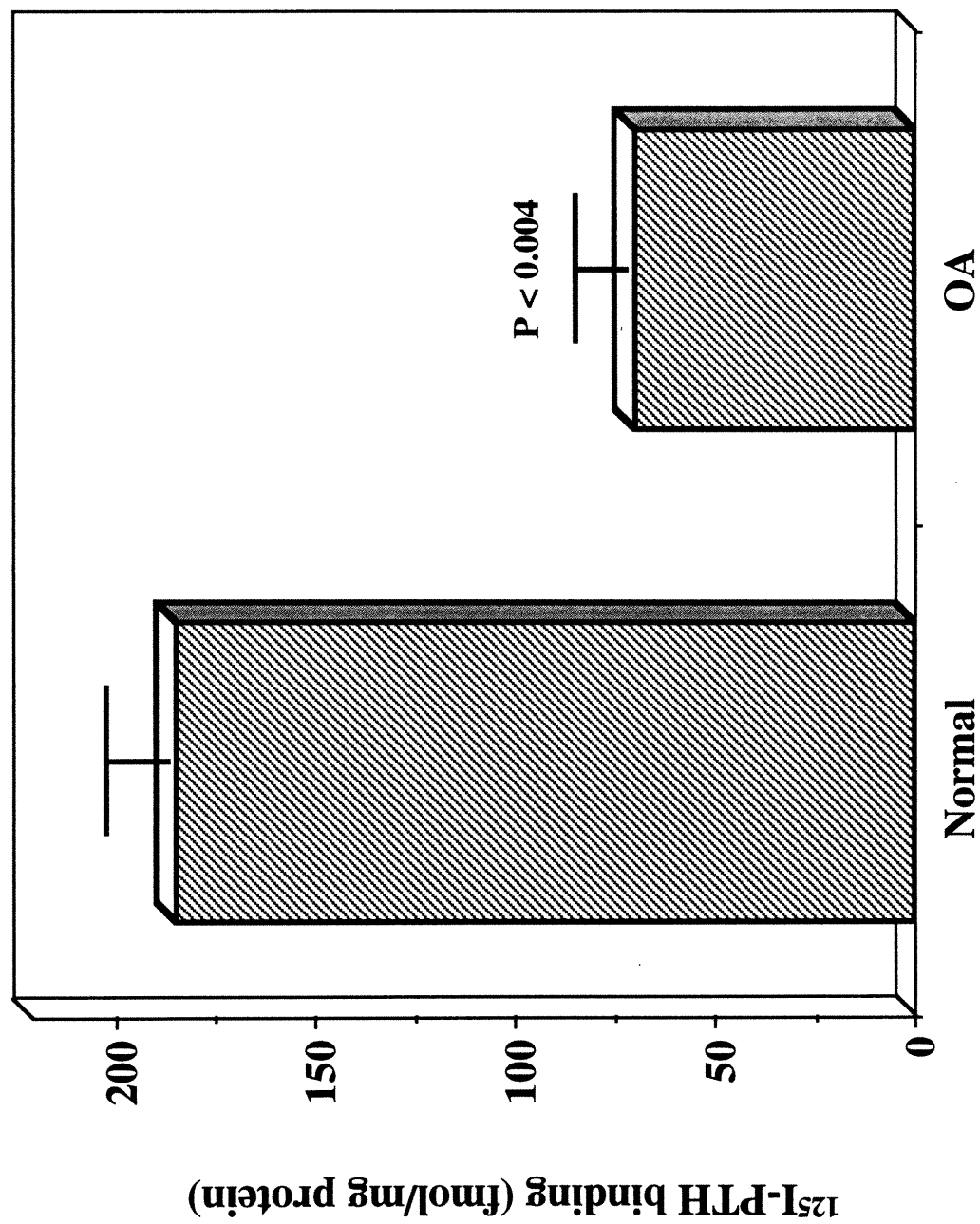


Figure 3

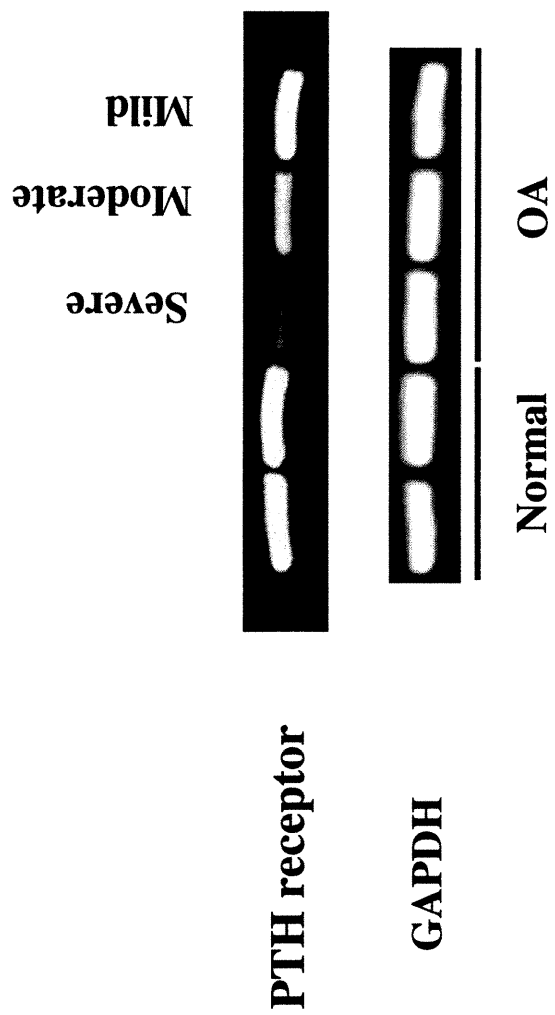
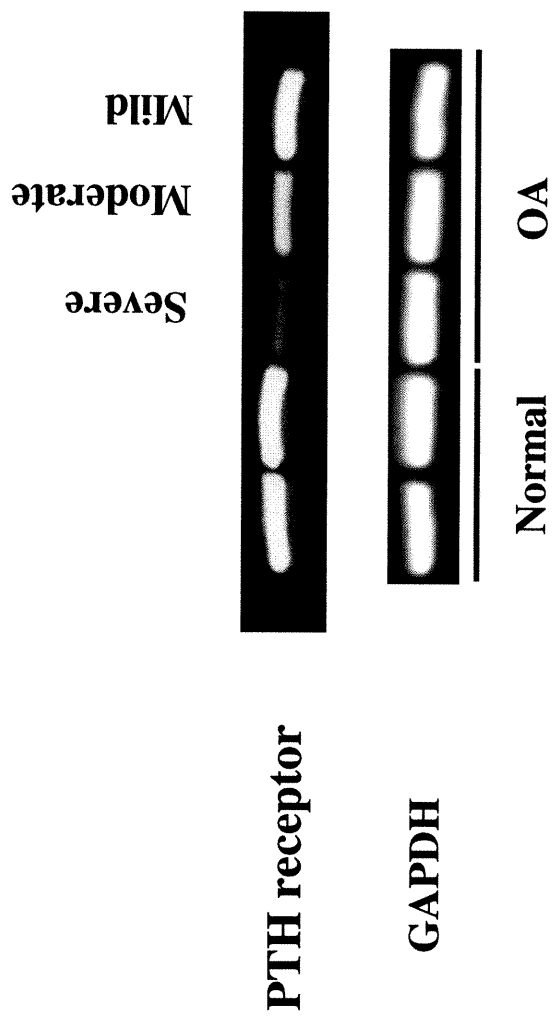
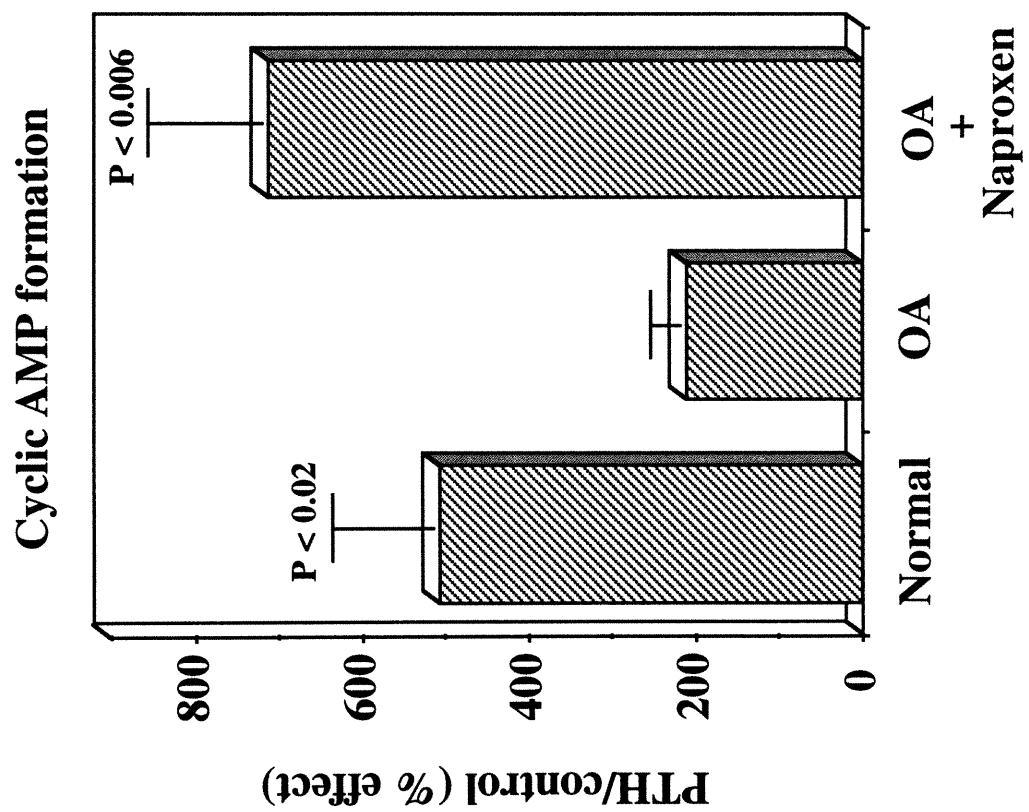
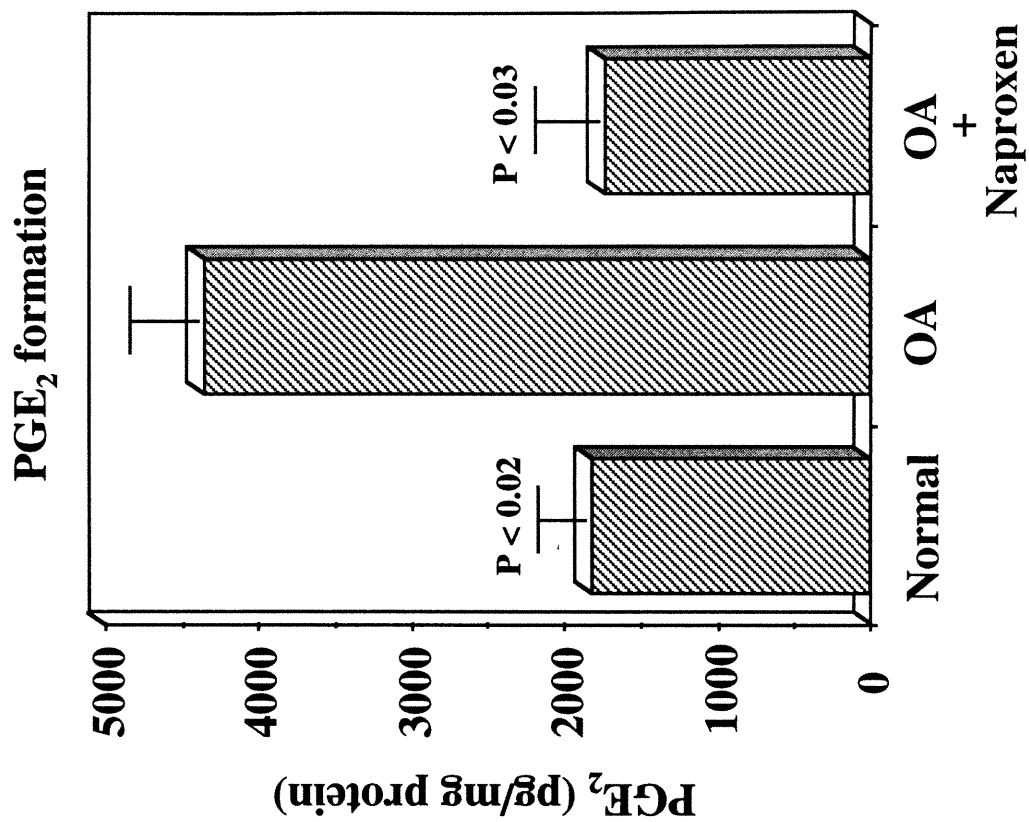


Figure 4





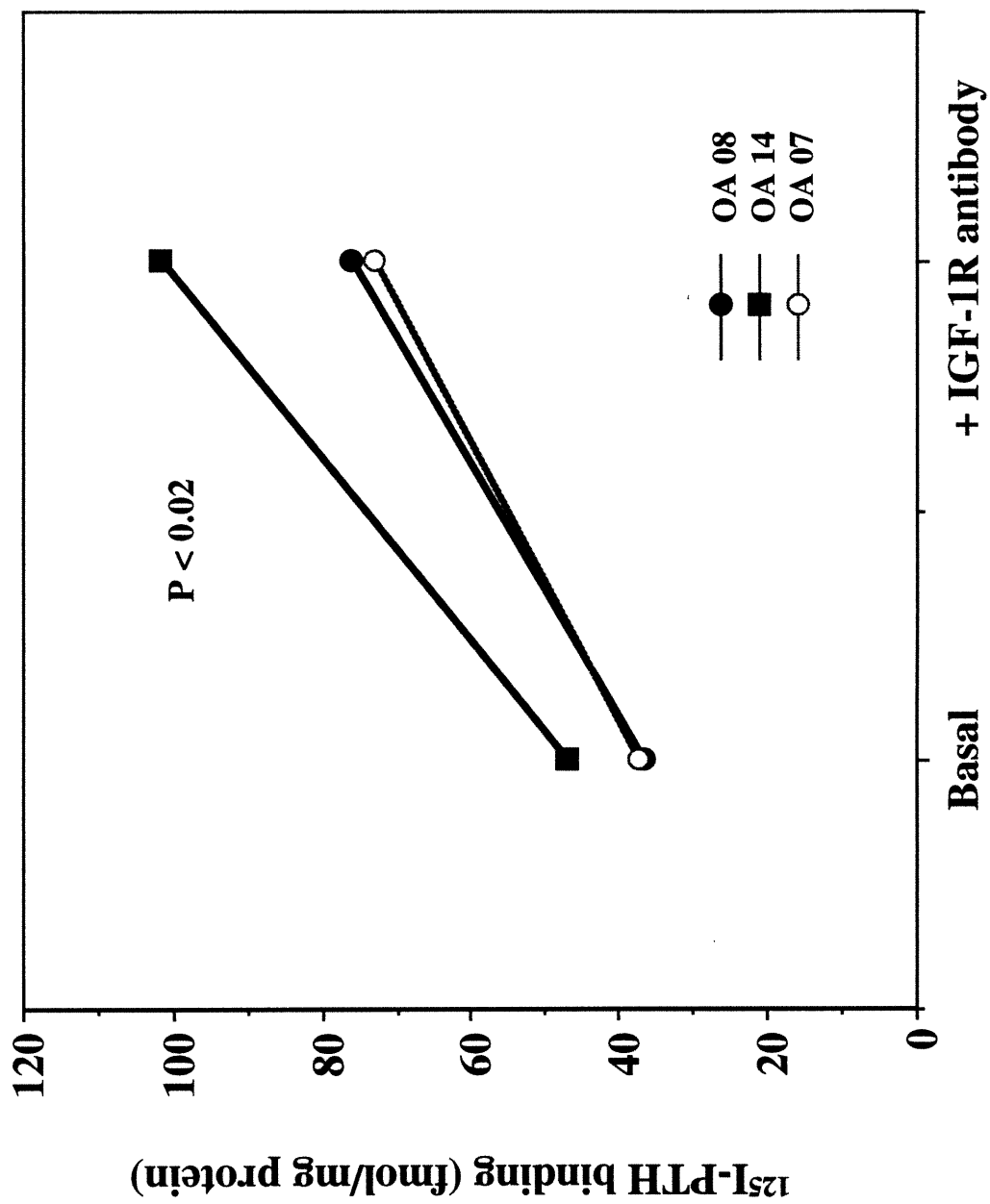


Figure 6

**C: RÉSULTATS
SUPPLÉMENTAIRES**

La biodisponibilité de l'IGF-1 est due soit à une augmentation de la synthèse de ce facteur de croissance soit à une diminution du niveau de ses protéines liantes. Nos résultats précédents ont montré que le niveau de l'IGF-1 libre est augmenté dans les ostéoblastes arthrosiques comparativement aux ostéoblastes normaux. La cause de cette augmentation est pour le moment inconnue. La diminution du niveau des IGFBPs est une possibilité qui pourrait répondre, au moins en partie, à cette question. Les résultats de ce petit chapitre montrent que les IGFBP-3, 4 et 5 sont diminuées dans les ostéoblastes arthrosiques ce qui expliquerait, en partie, l'augmentation de l'IGF-1 libre. De plus, la PTH, une hormone responsable de la synthèse de l'IGFBP-4, n'arrive pas à augmenter le niveau de cette protéine liante au niveau normal. Cette dernière observation appuie les résultats obtenus dans le troisième manuscrit que les ostéoblastes arthrosiques sont résistants à la PTH.

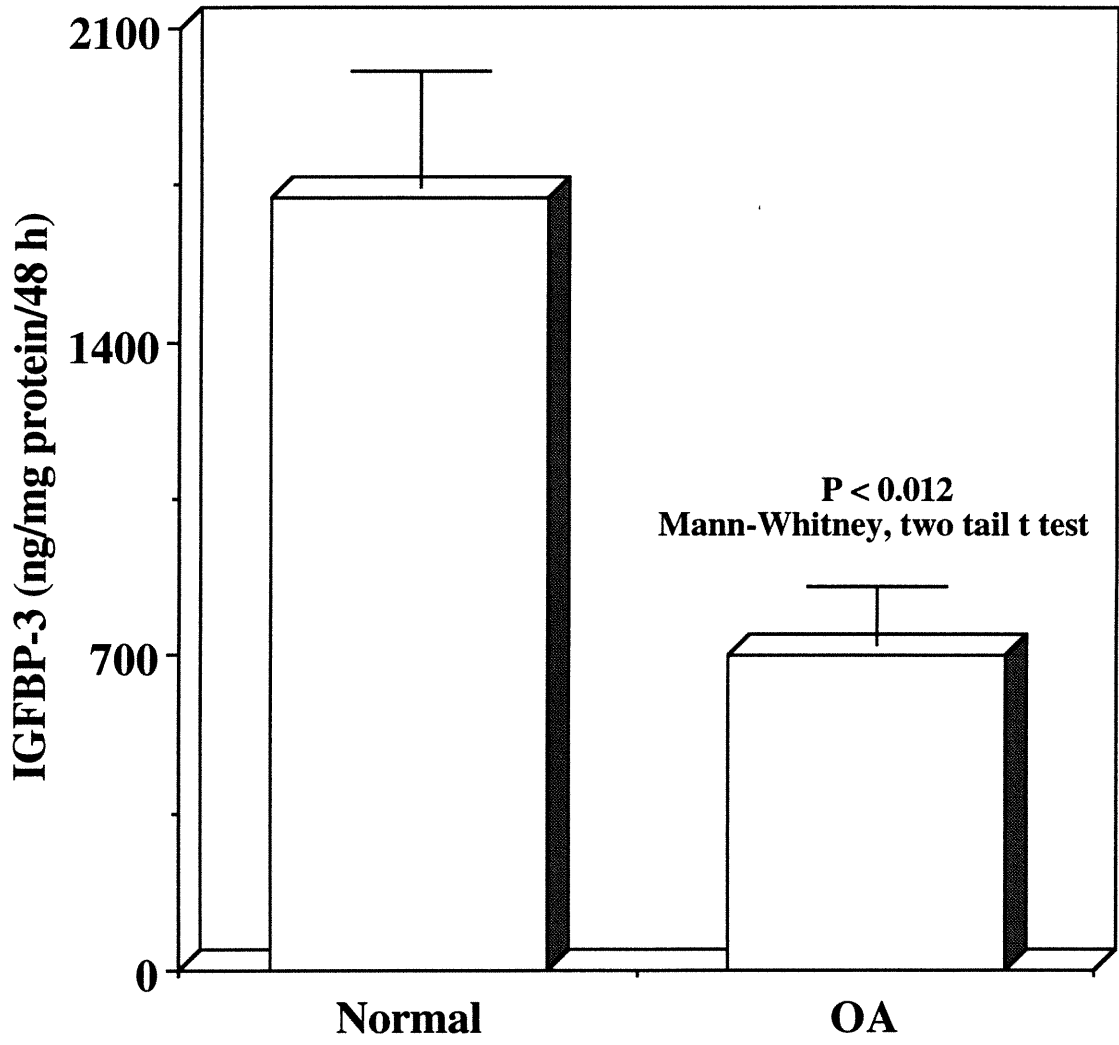


Figure R.S.1

Figure R.S.1: Les niveaux de l'IGFBP-3 produits par les ostéoblastes normaux et arthrosiques. Les ostéoblastes furent incubés 48h dans du milieu de culture DMEM HAM F-12 + 1% ITS (Insuline-Transferrin-Sélénium). Le milieu conditionné a été collecté et concentré 20 fois par centrifugation sur filtre avec un seuil de coupure à 10 Kd, puis le niveau d'IGFBP-3 fut détecté par ELISA.

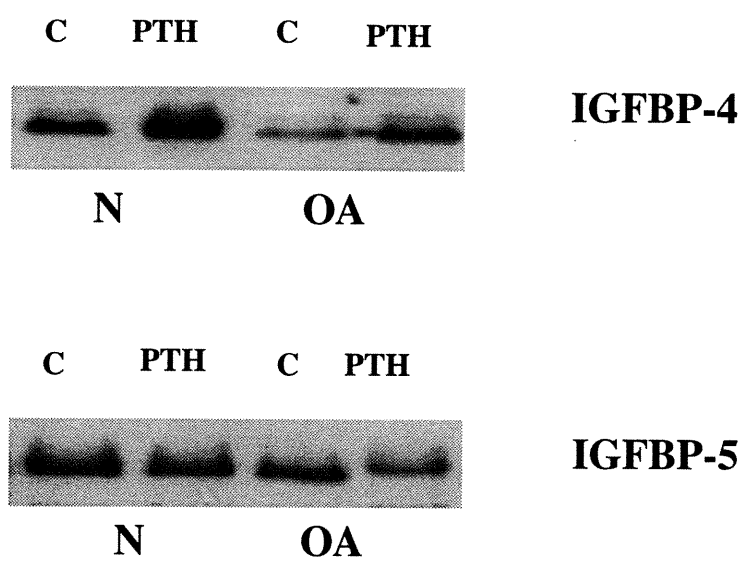


Figure R.S.2

Figure R.S.2: L'effet de la PTH sur les niveaux d'IGFBP-4 et 5 dans les ostéoblastes normaux et arthrosiques. Les ostéoblastes ont été traités avec le fragment 1-34 de la PTH (100 nM) pendant 48 h dans du milieu de culture DMEM HAM F-12 + 1% ITS (Insulin-Transferrin-Sélénium). Après le traitement, le milieu conditionné a été collecté et concentré 20 fois par centrifugation sur filtre avec un seuil de coupure à 10 Kd avant d'être utilisé pour l'analyse par Western Blot (25 µg prot/puit).

D:DISCUSSION





That Peter Paul Rubens (1577–1640) had a form of arthritis is well-known. In 1606, he developed pleuritis (inflammation of the lining of the lungs and thoracic cavity), which sometimes accompanies rheumatoid arthritis. A 1640 letter noted that his “hands are paralyzed for more than one month without hope he might still use his brushes.”

A group of physicians led by Dr. Thierry Appelboom concluded that deformities depicted in various subjects in successive paintings by Rubens were likely those of rheumatoid arthritis; they noted that the paintings appeared to show the natural progression of the disease. Appelboom observed, “as the progression is documented in the last 30 years of the life of Rubens, and not present in the works of his youth, it is possible that Rubens or a major collaborator in his studio ... suffered from the disease portrayed.”

One of the artworks analyzed, “The Holy Family With St. Anne,” was completed when Rubens was about 57 years of age. In the painting, the left hand of St. Anne, resting on Mary’s shoulder, is depicted with a characteristic swollen rheumatoid wrist.

References

Genneeskunde rond Rubens. Antwerp: Geneesheren huis; 1977.
JAMA. 1981;245:483–486.

“The Holy Family with St. Anne” (c 1633–c 1635) by Peter Paul Rubens; North Carolina Museum of Art, Raleigh. Purchased with funds from the State of North Carolina.



La sclérose de l'os sous-chondral chez les patients arthrosiques n'attiraient pas l'attention des chercheurs parce qu'elle était toujours considérée comme un phénomène de compensation suite à la dégradation du cartilage. Jusqu'en 1996, les travaux sur le métabolisme de l'os sous-chondral arthrosique furent très rares et non concluants. Notre laboratoire est un des premiers à investiger le métabolisme de l'os sous-chondral et le rôle potentiel de ce tissu dans le déclenchement et/ou la progression de l'arthrose.

L'os sous-chondral du plateau tibial.

Notre matériel de travail provenait du plateau tibial latéral (ou médial) des patients arthrosiques subissant un remplacement total du genou. L'os sous-chondral des patients arthrosiques était en général plus épais que l'os normal provenant d'individus normaux prélevé dans la même partie du tibia, mais généralement il était plus friable que l'os normal. Sa structure rigide apparaît être reliée à son épaisseur et non pas à une minéralisation accrue. En effet Mansell et son équipe (1998) ont montré que l'os trabéculaire de la tête fémorale des patients arthrosiques synthétise plus de collagène que l'os normal mais ce collagène est aussi immature à cause de l'absence partielle de la pyridinoline, une protéine créant un lien croisé entre les fibres de collagène et qui favorise la structure fibrillaire du collagène. Cette même équipe a démontré aussi que l'os arthrosique est moins minéralisé puisque la quantité de calcium osseux est diminuée par unité de protéine dans ce tissu.

Le phénotype des ostéoblastes arthrosiques de l'os sous-chondral

Nos résultats ont montré que les niveaux d'uPA (protéine et activité) et d'IGF-1 sont augmentés dans les explants arthrosiques comparativement aux explants normaux. Ces modifications peuvent être dues soit à un facteur systémique soit à un défaut primaire dans les ostéoblastes arthrosiques. Les résultats obtenus à partir des cultures cellulaires primaires des ostéoblastes ayant montré le même profil qu'avec les explants *ex vivo*, ceci tendrait à démontrer qu'un défaut cellulaire existe dans le tissu osseux arthrosique. Le fait que ces cellules continuent à sécréter plus d'uPA et d'IGF-1, et ce après plusieurs semaines de culture, démontre que l'anomalie vient d'un défaut dans la cellule elle-même et non pas d'un agent systémique ou local provenant d'un tissu avoisinant comme le cartilage et/ou la membrane synoviale. De plus, ces mêmes cellules ont montré une augmentation d'activité de la phosphatase alcaline avant et après traitement avec la vitamine D₃; l'ostéocalcine est aussi augmentée après traitement avec la vitamine D₃. À ces outils de caractérisation des ostéoblastes s'ajoute la réponse de ces cellules à des stimulations hormonales comme la PTH et la PGE₂. Encore une fois, ces cellules ont montré une anomalie qui s'est manifestée par le niveau de formation de l'AMPc qui est diminué dans les cellules arthrosiques après stimulation avec la PTH et complètement inhibé après stimulation avec la prostaglandine E₂. L'ensemble de ces résultats montre que les cellules osseuses provenant de patients arthrosiques ont un phénotype anormal (ou un métabolisme altéré) comparativement aux cellules osseuses provenant d'individus normaux. Ceci suggère donc une implication de l'os sous-chondral dans le déclenchement et/ou la progression de l'arthrose et modifie grandement notre perception de l'étiopathogénèse de l'arthrose. D'autres équipes de recherche ont aussi rapporté une anomalie dans ce tissu chez les patients arthrosiques (Westacott et al, 1997; Mansell et al,

1998; Bailey et al, 1997). En effet, Westacott et al ont montré que les ostéoblastes arthrosiques en culture primaire induisaient une dégradation plus grande du cartilage normal que les ostéoblastes normaux. De leur côté, l'équipe de Mansell et Bailey a démontré que l'os trabéculaire arthrosique de la hanche contenait plus de collagène immature et de minéraux, mais que le rapport calcium/collagène était toutefois diminué indiquant une augmentation de la fonction osseuse mais aussi une réduction de la minéralisation de ce tissu.

Comment nos résultats peuvent expliquer la sclérose de l'os sous-chondral arthrosique

La sclérose de l'os sous-chondral du genou est un épaississement de l'os cortical adjacent au cartilage du tibia. Cette observation est toujours associée à l'arthrose (Radin et al, 1970 et 1986) et elle est commune chez l'humain et l'animal. Chez l'animal, cette sclérose survient généralement avant la dégradation du cartilage (Carlson et al, 1993; Dedrick et al, 1993; Xang et al, 1993; Oettmeier et al, 1992; Carlson et al, 1996), une observation qui permet d'inférer que le tissu osseux puisse jouer un rôle important dans l'arthrose et non être que le reflet subséquent de la dégradation du cartilage.

Cette dernière observation chez l'animal n'a pas été effectuée chez l'humain parce que les stades précoces de l'arthrose sont asymptomatiques et les patients ne consultent pas à ce stade. En général, ce n'est qu'au stade avancé de la maladie et lorsque la douleur devient intense que le patient arthrosique consulte, donc lorsqu'il y a douleur ou malaise, donc à un stade modéré de la maladie. Mais il semble que la résorption osseuse est très forte dans l'os sous-chondral chez les patients arthrosiques au début de la maladie et que par la suite elle diminue, entraînant une sclérose osseuse tant au niveau trabéculaire que

sous-chondral (Ding et al, 1998; Douglas et al, 1997). Le système PA/Plasmine joue un rôle important dans le remodelage de la matrice osseuse en activant des protéases latentes présentes dans cette matrice. Ces protéases initient alors la résorption osseuse (Sato et al, 1989; Lyons et al, 1990; Allan et al, 1993). De plus, l'uPA peut augmenter sa propre biodisponibilité via un mécanisme de rétroaction positive. Ainsi, la plasmine générée par l'action de l'uPA sur le plasminogène coupe le scuPA en uPA actif (Kasai et al, 1985). Le système PA/Plasmine peut aussi moduler la biodisponibilité des IGFBPs (Campbell et al, 1992; Lalou et al, 1994). En effet Lalou et al (1994) ont montré que l'inhibition du système PA/Plasmine diminuait la dégradation d'une protéine liante, l'IGFBP-3. Cependant d'autres protéases à sérine et des métalloprotéases contrôlent aussi la biodisponibilité des IGFBPs (Thraikill et al, 1995; Delnay et al, 1995).

Nos propres résultats montrent deux comportements opposés de l'activité de l'uPA. Celle-ci est augmentée dans les ostéoblastes arthrosiques en situation basale, suggérant que l'activité spécifique de l'uPA dans les ostéoblastes arthrosiques est augmentée. De plus, l'IGF-1 est aussi augmenté mais les IGFBP-3, 4 et 5, des protéines liantes de l'IGF-1 qui modulent son action, sont diminuées chez les ostéoblastes arthrosiques comparativement aux ostéoblastes normaux. Toutefois, il y a une relation étroite entre toutes ces observations. En effet l'uPA, dont l'activité basale est élevée, peut dissocier davantage l'IGF-1 de ces protéines liantes dans les ostéoblastes arthrosiques (voir figure 6). Cette dissociation libère l'IGF-1 et ce dernier se trouve disponible en grande quantité comme nos résultats le démontrent. L'IGF-1 à son tour peut augmenter l'activité et la prolifération des ostéoblastes. Cette augmentation d'IGF-1 augmente la production de collagène et d'autres protéines matricielles par les ostéoblastes (Canalis et al, 1989; Hock et al, 1988; Ernest et al, 1987), une situation qui pourrait donc expliquer les résultats de

Subchondral bone

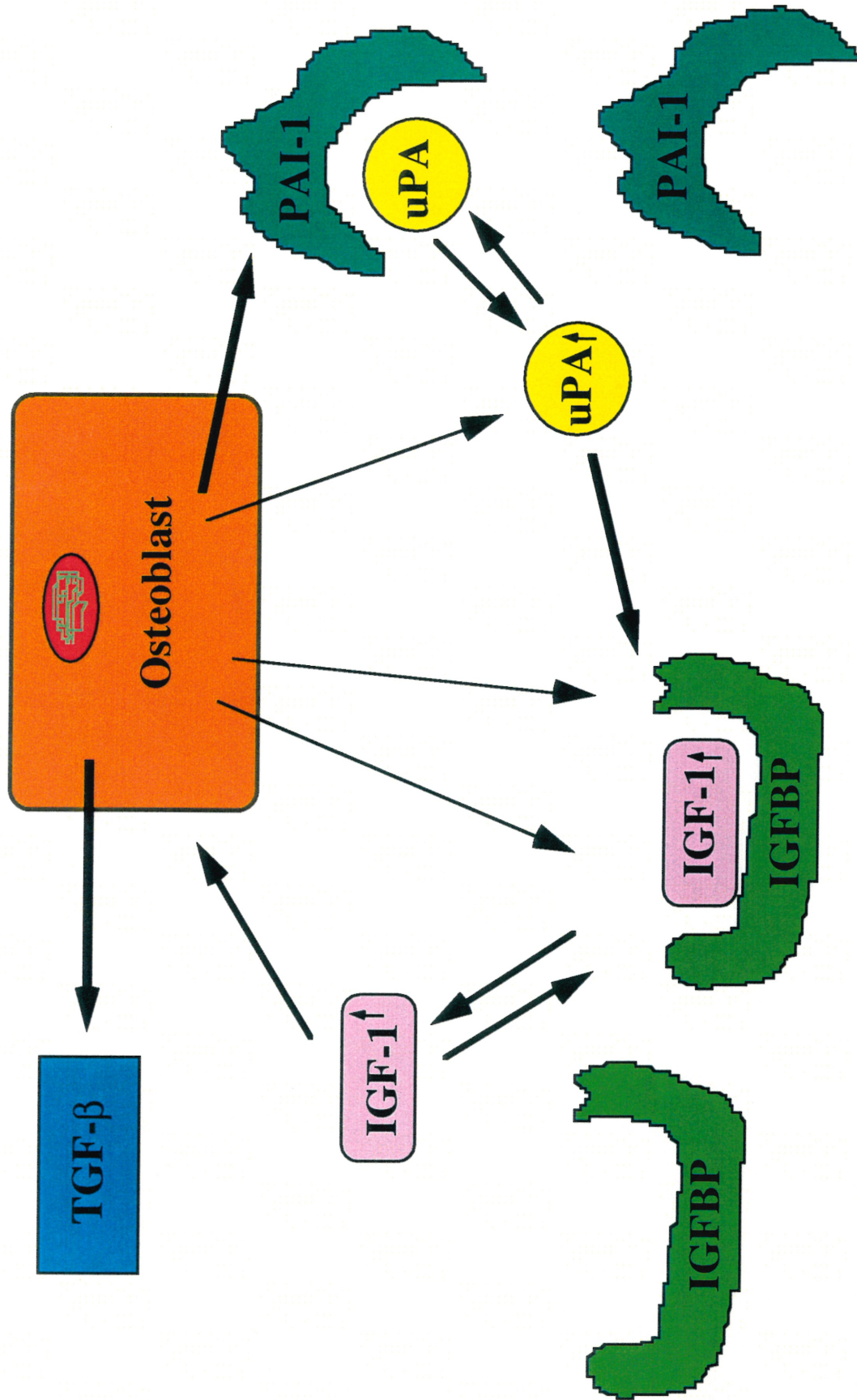


Figure 6: schéma résumant l'interaction entre les deux systèmes uPA/plasmine et IGF-1/IGFBP dans l'os sous-chondral arthrosique

Mansel et al (1998) et qui suggère un rôle important de l'os sous-chondral défectueux dans le développement de l'arthrose. Il faut mentionner aussi que le segment N-terminal de l'uPA peut servir comme facteur de croissance pouvant stimuler l'activité des ostéoblastes arthrosiques (Rabbani et al, 1991). L'observation d'une augmentation des niveaux d'IGF-1 dans les explants arthrosiques et les ostéoblastes arthrosiques obtenus ici concordent d'ailleurs avec celle de Dequeker et al (1993). Cependant, ceux-ci ayant utilisé des explants d'os de la crête iliaque de patients avec arthrose de la main et démontré une augmentation d'IGF-1, IGF-II et TGF- β dans un tissu osseux non portant contrairement au tissu du genou tel que nous avons employé, indique que cette modification des niveaux d'IGF-1 n'est pas l'apanage exclusif de l'os sous-chondral arthrosique mais qu'il semble exprimé par tout le tissu osseux chez les patients atteints d'arthrose. Cette situation implique aussi que ces modifications seraient le résultat d'une altération cellulaire généralisée des ostéoblastes et non seulement le reflet d'un contrôle systémique ou local. La conséquence de l'augmentation de ce facteur de croissance est une stimulation possible de la cellularité des ostéoblastes et une augmentation dans la synthèse du collagène. Des résultats de notre laboratoire ont montré sur coupes histologiques une augmentation du nombre d'ostéoblastes dans l'os sous-chondral arthrosique comparativement à l'os normal. De plus ces coupes histologiques ont montré aussi que les travées de l'os trabéculaire sont plus épaisses et plus denses. Cette augmentation de la cellularité par unité de surface au niveau de l'os sous-chondral du genou arthrosique peut aussi expliquer en partie l'augmentation du niveau de collagène dans la tête fémorale de patients arthrosiques (Mansell et al, 1998), malgré que ce collagène soit immature et moins minéralisé que l'os normal (Mansell et al, 1998; Li et al, 1997).

Le processus de minéralisation osseuse est complexe et un remodelage osseux altéré pourrait expliquer la sclérose de l'os arthrosique. Parmi les éléments impliqués dans le remodelage osseux, nous avons déjà démontré le rôle de l'IGF-1 et de l'uPA dans le tissu arthrosique. Par ailleurs, une augmentation du collagène, déjà décrit dans ce tissu (Mansell et al, 1998), ne peut à lui seul expliquer cette sclérose. Toutefois, la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine peuvent aussi jouer un rôle clef. L'activité de la phosphatase alcaline, qui est associée avec la formation osseuse, est aussi augmentée dans les ostéoblastes arthrosiques (Hilal et al, 1998) et dans les explants d'os fémoraux arthrosiques (Mansell et al, 1998). L'augmentation de l'activité de cette phosphatase signale une augmentation de la formation osseuse. Ainsi l'augmentation de la formation de collagène et de l'activité de la phosphatase alcaline suggère une activité des ostéoblastes arthrosiques mais n'indique pas que le processus de minéralisation osseuse soit stimulé.-L'ostéocalcine est une protéine associée avec le remodelage osseux, mais son rôle exact reste toujours incompris. Toutefois, des travaux récents chez des souris dont le gène d'ostéocalcine a été délété (osteocalcin knock-out mouse) indique que l'ostéocalcine, bien que produite par l'ostéoblaste, retarde la formation osseuse (Ducy et al, 1996). Ainsi nos résultats montrant que la synthèse de cette protéine est augmentée après stimulation avec la vitamine $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ dans les ostéoblastes arthrosiques plus que dans les ostéoblastes normaux suggèrent que la formation osseuse soit retardée dans le tissu pathologique. Cette observation va à l'encontre des résultats pour le collagène et l'activité de la phosphatase alcaline. Cependant ces résultats s'expliqueraient mieux par une augmentation de l'activité individuelle des ostéoblastes, fonction accrue par cellule plutôt que plus de cellules avec la même activité. Une activité individuelle accrue se traduirait alors par le dépôt d'une matrice plus importante sans être plus minéralisée. Ce

résultat confirme aussi d'autres travaux qui ont rapporté que l'ostéocalcine est augmentée dans le sérum des patients arthrosiques et dans les explants provenant de la crête iliaque (Grevers et al, 1989a; et 1989b; Raymaekers et al, 1992).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'os sous-chondral arthrosique est anormal ou altéré. L'augmentation de la synthèse du collagène, la diminution de la minéralisation, l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et l'ostéocalcine expliquent en partie le fonctionnement anormal de l'os sous-chondral arthrosique. La faible résistance de cet os dû à l'immaturation du collagène, et la diminution de la minéralisation par unité de surface sont possiblement responsables des microfractures observées régulièrement dans ce tissu (Radin et al, 1978 et 1986). Ces microfractures peuvent être les canaux conduisant les agents chimiques responsables de la dégradation du cartilage. De plus, la sclérose de l'os sous-chondral rend ce dernier moins absorbant pour les chocs. Le cartilage devra donc absorber alors plus de pression ce qui déstabilisera sa structure et favorisera sa dégradation.

L'interrelation entre les deux systèmes PA/Plasmine et IGF/IGFBPs dans les ostéoblastes arthrosiques nous a permis de mieux comprendre les causes possibles de l'anomalie de l'os sous-chondral arthrosique. En effet, nos résultats ont montré que le traitement des ostéoblastes avec l'IGF-1 inhibe la génération de la plasmine, responsable de l'activation de plusieurs enzymes protéolytiques dans la matrice osseuse. Par contre, l'IGF-1 n'a aucun effet sur ce système dans les ostéoblastes normaux. Si cette stimulation *in vitro* est présente *in vivo* ceci peut signifier une (des) anomalie(s) de l'os pathologique. En effet, la diminution de la production de la plasmine diminue l'activation des enzymes latentes responsables de la résorption osseuse. Puisque les ostéoblastes arthrosiques sont très actifs et sécrètent plus de collagène, ceci causerait aussi un déséquilibre entre la

formation et la dégradation de la matrice osseuse favorisant une sclérose ou un épaissement de l'os sous-chondral.

Une opinion générale qui reste toujours controversée est que le risque de développement de l'arthrose augmente avec l'augmentation de la masse osseuse (Lane et al, 1994; Sowers et al, 1996; Marcelli et al, 1995). Toutefois, les hommes et les femmes afro-américains qui possèdent une masse osseuse plus élevée que la population caucasienne, ne sont pas plus prédisposés à développer l'arthrose. Ceci suggère qu'une masse osseuse relativement élevée ne serait pas une cause de l'arthrose mais une sclérose de l'os sous-chondral accompagnée d'une anomalie pourraient être reliés au développement de cette maladie, comme c'est le cas de l'os sous-chondral arthrosique.

Ainsi nos travaux permettent, en partie, d'expliquer la sclérose osseuse associée à l'arthrose mais permettent de plus de souligner l'importance de l'os comme cible primaire de cette maladie. Cette hypothèse est d'ailleurs aussi étayée par les travaux de plusieurs équipes. En effet, Westacott et al (1997) ont montré que les ostéoblastes arthrosiques en coculture avec des explants normaux de cartilage, relarguent plus de glycosaminoglycanes que les ostéoblastes normaux qui sont également en coculture. Ceci montre encore une fois que l'os chez les patients arthrosiques peut influencer le métabolisme du cartilage. L'augmentation de l'activité de l'os sous-chondral peut aussi expliquer la détérioration de la situation des personnes atteintes d'arthrose après 12 ans de traitement avec l'IGF-1, le niveau de l'IGF-1 étant associé à la sévérité de la maladie et à la formation d'ostéophytes (Schouten et al, 1993).

La sclérose osseuse et l'augmentation de la cellularité chez le patient arthrosique peut aussi s'expliquer, non point par une augmentation de la formation osseuse seule, mais par une réduction de la résorption osseuse. Bien qu'au stade initial de la maladie, la

résorption osseuse puisse être augmentée, cette tendance semble s'inverser avec la progression de la maladie. Cette situation implique donc qu'il puisse y avoir des modifications importantes des mécanismes de contrôle de la résorption osseuse dans l'arthrose, et parmi ces systèmes, nous avons étudié la réponse à la stimulation par la PTH, le PGE₂ et le système uPA/Plasmine. Nos résultats ont montré que les ostéoblastes arthrosiques sont résistants à la PTH et à la PGE₂, une situation qui pourrait entraîner une réduction de la résorption osseuse. Par ailleurs, les niveaux de PGE₂ mesurés dans les ostéoblastes arthrosiques sont beaucoup plus élevés que dans les ostéoblastes normaux. La diminution de la formation de l'AMPc par les ostéoblastes arthrosiques suite à une stimulation avec la PGE₂ n'est donc probablement qu'une simple désensibilisation homologue du récepteur de PGE₂ dû au niveau élevé de PGE₂. La diminution de réponse à la PTH n'est probablement pas liée à une désensibilisation homologue, les ostéoblastes ne produisent pas la PTH et très peu du PTHrp. Par contre, une diminution de synthèse d'AMP cyclique en réponse à la PTH peut s'expliquer par différents mécanismes. La PTH médie son effet via un récepteur couplé à des protéines G (G_s et G_i) et à une adénylate cyclase. Pour essayer d'expliquer cette résistance, nous avons étudié l'activité de l'adénylate cyclase, l'activité des protéines G_s et G_i et le nombre de récepteurs à la PTH ainsi que le niveau de l'expression de l'ARN messager du récepteur à la PTH. Une stimulation directe de l'adénylate cyclase à l'aide de la forskoline a produit des niveaux d'AMPc similaires entre ostéoblastes normaux et arthrosiques, ce qui démontre que cette activité est intacte dans les ostéoblastes arthrosiques. Par ailleurs, la toxine du choléra n'a pas réussi à augmenter significativement la formation de l'AMPc après stimulation avec la PTH ce qui signifie que l'activité de la protéine G_s est partiellement inhibée et cause en partie cette résistance à la PTH. Nos résultats ne peuvent pas être dûs à un artéfact

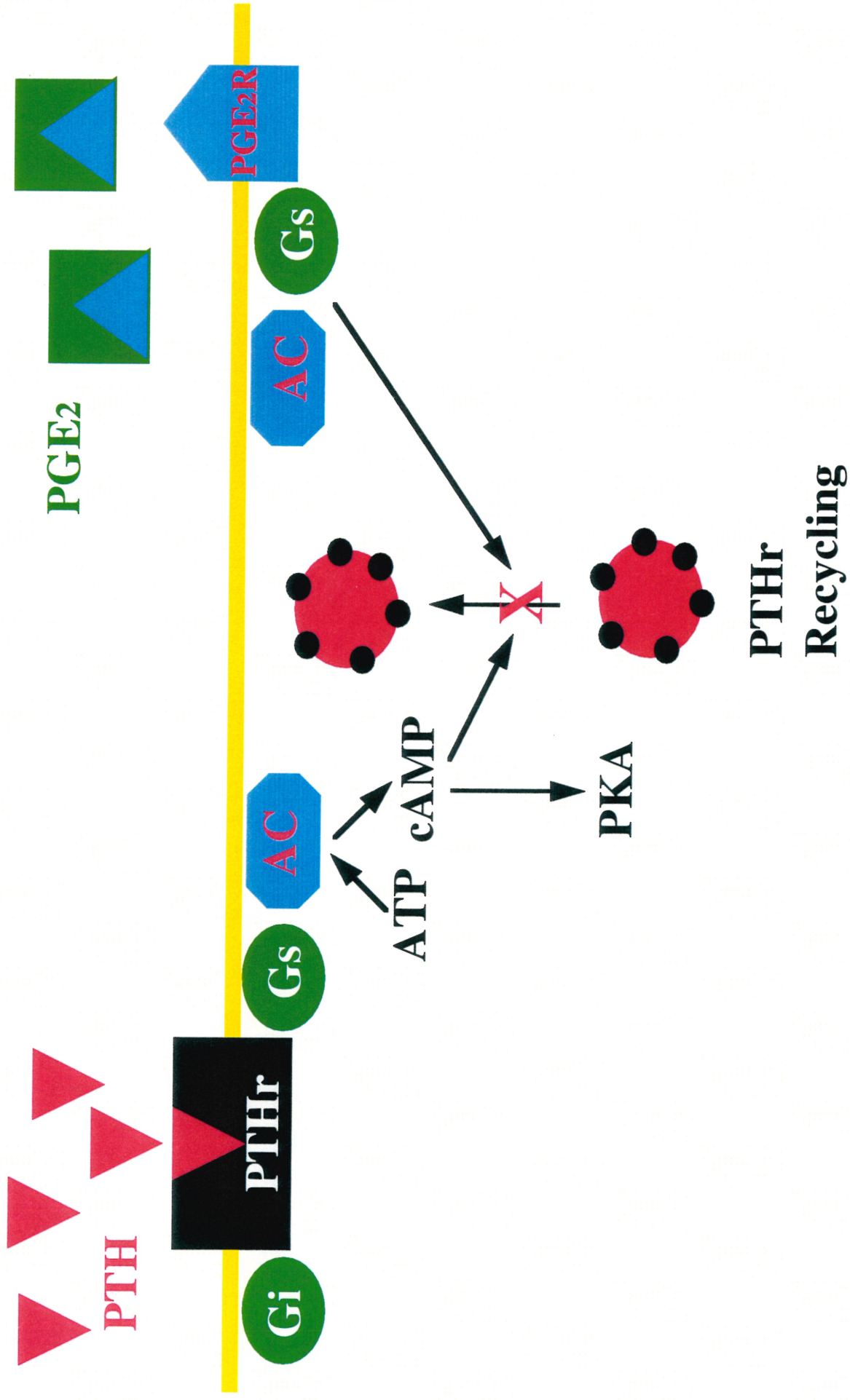


Figure 7: schéma explicatif de la désensibilisation homologue et hétérologue du récepteur à la PTH

puisque la toxine de pertussis inhibe de son côté complètement l'effet de la PTH. On peut donc en conclure que la protéine Gi est tout à fait active. De plus, l'étude de liaison à l'aide du ^{125}I -PTH ayant montré que le niveau du récepteur à la PTH est diminué de 50 %, cette observation explique aussi en partie la diminution de la réponse à la PTH. La diminution du récepteur à la PTH peut alors être due à une désensibilisation hétérologue via le PGE₂ ou à une inhibition de l'expression du récepteur. Une désensibilisation homologue d'un récepteur est normalement observée après une longue exposition à son agoniste. C'est le cas du récepteur à la PTH (Teitelbaum et al, 1986; Fukayama et al, 1994). En effet, Fukayama et son équipe (1994) ont montré que suite à une incubation de 24 h et plus avec la PTH humaine, les récepteurs à cette hormone diminuent de 50% dans les cellules SaOS-2, un modèle cellulaire d'ostéoblastes humains provenant d'un ostéosarcome. Cet effet est mimé par un analogue de l'AMPc, le dibutyryl-AMPc. Cette désensibilisation homologue touche seulement le récepteur lui-même tandis que le niveau d'ARNm reste normal. Ceci est aussi observé chez d'autres types de cellules comme les cellules osseuses de souris (Heursche et al, 1983; Kent et al, 1980), les "opossum Kidney Cells" (Teitelbaum et al, 1986) et les cellules osseuses d'un ostéosarcome de rat (voir figure 7) (Yamamoto et al, 1988). La désensibilisation n'affecte pas seulement le récepteur à la PTH, mais cause aussi une modification dans le fonctionnement des protéines Gs et Gi (Heyworth et al, 1984; Kirchik et al, 1983). La prostaglandine E₂, qui génère aussi l'AMPc, peut causer une internalisation et inhiber le recyclage du récepteur à la PTH si les cellules sont exposées longtemps à cet agent (Pines et al, 1989; Mitchell et al, 1990). La désensibilisation hétérologue causée par la PGE₂ est indépendante de l'activité de l'adénylate cyclase mais dépend de la protéine Gs, sensible

à la toxine de choléra (Pines et al, 1989); donc ce phénomène est indépendant de l'AMPC, contrairement à la désensibilisation homologue par la PTH (voir figure 7).

Nos résultats ont montré que les ostéoblastes arthrosiques produisent de 2 à 3 fois plus de PGE₂ que les ostéoblastes normaux, probablement dû à une augmentation de l'activité de la cyclooxygénase (COX), phénomène déjà noté dans les chondrocytes arthrosiques (Chan et al, 1995). Ainsi une désensibilisation hétérologue est possible et de plus, l'inhibition du COX avec le Naproxen a ramené le niveau de la PGE₂ à la normale et a augmenté la production d'AMPC à un niveau normal après stimulation avec la PTH. Ceci suggère que la diminution du nombre de récepteurs à la PTH dans les ostéoblastes arthrosiques est aussi dû en partie à la désensibilisation hétérologue par la PGE₂ et à une diminution du recyclage de ce récepteur.

L'observation que l'expression de l'ARNm du récepteur à la PTH est fortement diminuée dans les ostéoblastes arthrosiques ne peut cependant s'expliquer par une désensibilisation du récepteur. Cette situation s'explique mieux par l'action directe de l'IGF-1 sur ces cellules. En effet, des études très récentes ont montré que l'IGF-1 inhibe l'expression du récepteur à la PTH (Kawane et al, 1999) dans des ostéoblastes de rat. Puisque les ostéoblastes arthrosiques sécrètent plus d'IGF-1 que les ostéoblastes normaux, cette élévation d'IGF-1 pourrait être, en partie, la cause de l'altération de l'expression du récepteur à la PTH. De plus, Bichel et al (1993) ont montré que la PGE₂ peut moduler la production de l'IGF-1 dans les ostéoblastes de rat. Donc la PGE₂ pourrait être responsable, au moins partiellement, de ce niveau élevé d'IGF-1 chez les patients arthrosiques. Malgré le fait que l'IGF-1 soit un facteur de croissance et ait des effets bénéfiques sur les ostéoblastes et l'os en général, il est aussi associé à la sévérité de l'arthrose et à la formation des ostéophytes chez les patients atteints de cette maladie

(Schouten et al, 1993). Cette interrelation qui semble exister entre l'IGF-1, le PGE₂ et le récepteur à la PTH est une observation très importante qui devrait être poursuivie afin de vérifier si ceci est une voie d'approche thérapeutique. La PTH induit la résorption osseuse en recrutant et activant les ostéoclastes, cellules responsables de la dégradation de la matrice osseuse. L'action de la PTH n'est pas directe, elle agit sur les ostéoblastes et active par la suite les ostéoclastes via probablement un messenger chimique. Ainsi la diminution du niveau de récepteurs à la PTH dans les ostéoblastes peut inhiber partiellement la résorption osseuse. Si cette observation *in vitro* est garante de la situation *in vivo*, ceci implique qu'une diminution de la résorption osseuse soit présente chez les patients arthrosiques, un autre mécanisme qui peut contribuer à la sclérose de ce tissu.

Nous avons aussi montré que la diminution de l'ARNm du récepteur à la PTH varie selon la sévérité de la maladie. En effet, les patients subissant un remplacement total du genou ne présentent pas tous la même sévérité de dégradation du cartilage articulaire, bien que ce dernier soit toujours dégradé. Ainsi, les niveaux plus variables de récepteurs à la PTH pourraient refléter une altération à un autre niveau contrôlant l'expression du récepteur à la PTH. Ainsi, des travaux récents ayant démontré que l'IGF-1 peut inhiber l'expression du récepteur à la PTH et que les niveaux d'IGF-1 produits étaient variables mais plus élevés dans les ostéoblastes arthrosiques vs normaux, nous avons abordé cette question en bloquant l'effet de l'IGF-1 avec un anticorps bloquant son récepteur. Nos résultats ont démontré une augmentation similaire de la liaison de ¹²⁵I-PTH à la fois dans les ostéoblastes arthrosiques et normaux. Ceci suggère donc que l'IGF-1 régule l'expression du récepteur à la PTH dans les ostéoblastes humains tel que décrit chez le rat (Kawane et al, 1999), mais ceci souligne encore le rôle fondamental de l'IGF-1 dans la progression et/ou l'initiation de l'arthrose. Toutefois, le(s) mécanisme(s) qui régit(ssent) cette

élévation d'IGF-1 est toujours sous investigation. Le rôle potentiel du système uPA/plasmine, des protéines liantes de l'IGF-1 (IGFBPs) et du niveau de PGE₂ produit par les ostéoblastes arthrosiques demeure des avenues potentielles pour expliquer cette situation. Nous avons d'ailleurs étudié ici le rôle de l'uPA, qui semble limité, et celui des IGFBPs qui sont toutes diminuées dans les ostéoblastes arthrosiques même après stimulation par la PTH. Par contre le rôle potentiel du PGE₂ dans le contrôle du niveau d'IGF-1 est toujours sous étude.

La sclérose de l'os sous-chondral serait-elle la cause de l'arthrose?

Toutes les évidences dans la littérature supportent l'hypothèse que l'os sous-chondral pourrait être le déclencheur de la dégradation du cartilage, mais rien n'est concluant. Nos résultats ont montré deux éléments de première importance dans la résorption osseuse qui sont défectueux *in vitro*: la diminution de la génération de la plasmine et la résistance des ostéoblastes arthrosiques à la PTH. Le comportement de ces deux systèmes n'a pas encore été étudié *in vivo* ce qui nous obligera à discuter, sous toute réserve, d'un défaut de l'os sous-chondral chez les patients arthrosiques. Le comportement des cellules *in vitro* reflète au moins une facette de leur comportement *in vivo*. Donc nos résultats ont montré que les ostéoblastes arthrosiques ne réagissent pas de la même façon que les ostéoblastes normaux. Il serait toujours intéressant de répéter les mêmes expériences avec des ostéoblastes provenant de patients arthrosiques au début de leur maladie afin de montrer que le métabolisme de l'os change au début de la maladie ou durant sa progression. Plusieurs travaux récents ont démontré un changement radiographique de l'os sous-chondral au début de la maladie. En effet, Peterson et al (1998) ont montré que la protéine oligomérique matricielle du cartilage (COMP) et la sialoprotéine (BSP) de

l'os sont augmentées dans le sérum chez des individus qui présentaient une douleur au genou sans aucune évidence d'arthrose par radiographie, mais qui ont développé cette maladie par la suite, soit au moins 3 ans plus tard. Cette étude suggère que les changements dans le métabolisme du cartilage et de l'os coïncident dans l'arthrose. De plus ces deux protéines sont des marqueurs potentiels pour détecter et soigner l'arthrose en stade précoce, une intervention médicamenteuse pouvant alors prévenir le développement de l'arthrose (Conrozier et al, 1998). Dans les modèles expérimentaux, un changement dans le volume ostéoïde de l'os sous-chondral du tibia est survenu en même temps que le début de la dégradation du cartilage chez des chiens ayant subi une chirurgie avec angulation de 30 degrés valgus (Panula et al, 1998). De plus, dans ce modèle canin, la formation des cystes dans l'os sous-chondral est survenue à un stade précoce de l'arthrose (Baird et al, 1998). Par ailleurs, l'arthrose induite chez les rats par l'injection d'acide mono-iodo-acétique montre une augmentation dans le métabolisme de l'os sous-chondral et dans le cartilage profond avant tout changement dans le cartilage de surface, ce qui montre que dans ce modèle d'arthrose, le changement métabolique dans l'os sous-chondral précède la dégradation du cartilage (Saied et al, 1997).

Finalement, d'autres travaux très récents suggèrent une image chronologique du développement de l'arthrose en mettant l'accent sur les changements morphologiques et biochimiques de l'os sous-chondral. Ce dernier s'amincit d'abord au stade initial de l'arthrose (Ding et al, 1998; McGibbon et al, 1998), précédant le début de la dégradation du cartilage (Wei et al, 1998), puis présente une formation d'ostéophytes, une sclérose et la formation de cystes (Dougados et al, 1997). Au stade plus avancé de la maladie, l'os sous-chondral perd des minéraux (Li et al, 1997) et est envahi par des micro-vaisseaux

sanguins causant des microfractures (Burr et al, 1997). En phase terminale de la maladie, les ostéoblastes arthrosiques ont montré une tendance à contribuer à la dégradation du cartilage (Matsui et al, 1997; Westacott et al, 1997).

À la lumière de ces travaux, nous pouvons dire avec une grande assurance que la perception de la maladie de l'arthrose a complètement changé au cours de la dernière décennie. La sclérose de l'os sous-chondral chez les patients arthrosiques attire de plus en plus l'attention des chercheurs, puisqu'il pourrait s'agir d'une manifestation majeure sinon initiale de la maladie. Nos propres travaux indiquent deux phénomènes importants. Le premier est que notre perception de l'arthrose est maintenant modifiée puisque nous avons démontré un défaut primaire des ostéoblastes de patients arthrosiques, défaut qui peut expliquer la sclérose osseuse par une augmentation des mécanismes de formation et une diminution des mécanismes de résorption osseuse. Le second est que nos travaux démontrent une nouvelle voie possible de régulation du système uPA/plasmine par l'IGF-1 dans l'arthrose, mécanisme qui pourrait être présent normalement mais devient altéré dans les ostéoblastes arthrosiques. Cette nouvelle voie de régulation contribue donc à élargir nos connaissances générales du métabolisme osseux et pourrait devenir la cible d'interventions thérapeutiques.

E: CONCLUSION





arinus van

Reymerswaele (c 1497–c 1567) was among the first Flemish genre painters. From what is known of his work, he appears to have specialized in half-length, life-size portraits of bankers, usurers, tax collectors, saints, and other worthies surrounded by books, papers, and documents.

In "St. Jerome Meditating on Death," van Reymerswaele depicts the saint as a cardinal contemplating the mortality of man. The open book at his side shows an illustration of the Last Judgment. St. Jerome (c 342–420), an early church father, biblical scholar, and humanist, was revered and depicted by many Northern European artists. Van Reymerswaele produced numerous paintings of the saint, inspired by a picture created by Albrecht Dürer in 1521.

Several features of the anonymous individual who posed for the St. Jerome portrait appear to show characteristics of localized scleroderma (chronic hardening and thickening of the connective tissues). In the 1930s, Laignel-Lavastine, a medical professor on the Faculty of Medicine in Paris, noted that the pointed nose, sclerotic fold of skin below the cheekbone, and drawn-in lips are typical signs of this condition.

Reference

Aesculape. 1934;24:66–71.

"St. Jerome Meditating on Death" by Marinus van Reymerswaele (c 1497–c 1567); copyright © Prado Museum, Madrid; all rights reserved.



Jusqu'à présent, la majorité des travaux portant sur l'arthrose considérait la sclérose osseuse de l'os sous-chondral comme un épiphénomène de la maladie. Ainsi, les travaux concernant ce tissu étaient descriptifs et offraient peu de détails sur le fonctionnement et le métabolisme des ostéoblastes pouvant expliquer le phénomène de sclérose. L'hypothèse d'un phénomène secondaire à la dégradation du cartilage chez les patients arthrosiques est elle-même controversée, aucune évidence directe n'ayant été apportée pour l'étayer. La sclérose d'un tissu est toujours un phénomène anormal qui est le résultat soit d'une action systémique ou d'un défaut cellulaire du tissu. Notre hypothèse de travail était qu'un défaut cellulaire des ostéoblastes pourrait être responsable de cette sclérose et contribuer à la dégradation du cartilage chez les patients arthrosiques.

Pour démontrer notre hypothèse, nous avons étudié le tissu osseux arthrosique *ex vivo* et *in vitro*, pour dissocier un effet systémique d'un effet cellulaire. Nos résultats ont démontré que les anomalies observées *ex vivo* avec du tissu osseux étaient reproduites *in vitro* avec des ostéoblastes isolés chez ces patients, suggérant fortement un défaut cellulaire. Cette situation renverse donc nos conceptions actuelles de l'arthrose, et suggère de nouvelles avenues d'intervention thérapeutique. Nos travaux ont aussi indiqué un dysfonctionnement de deux systèmes clefs du remodelage osseux chez ces patients, soit le système uPA/plasmine et le système IGF/IGFBPs. Ces anomalies sont d'autant plus importantes que celles-ci pourraient expliquer la sclérose osseuse, et jeter une lumière nouvelle sur le rôle potentiel du tissu osseux dans l'étiopathogénèse de l'arthrose. Par ailleurs, les anomalies du remodelage osseux dans le tissu arthrosique ne sont probablement pas reliées uniquement au dysfonctionnement de l'uPA/plasmine et de l'IGF/IGFBP car la signalisation par l'hormone parathyroïdienne est aussi modifiée dans

les ostéoblastes arthrosiques. Cette dernière situation pourrait aussi affecter une grande variété de mécanismes cellulaires dépendant de la PTH mais cette situation peut aussi être reliée à une anomalie de la réponse à l'IGF-1 dans ces cellules. L'ensemble de ces résultats suggère donc que les ostéoblastes arthrosiques se comportent anormalement suite à un défaut cellulaire et non systémique. L'hypothèse de départ d'un défaut cellulaire des ostéoblastes est donc démontrée, par contre la démonstration formelle de l'implication de ce défaut dans l'apparition ou dans la progression de l'arthrose reste à faire, bien que nos travaux, couplés à ceux de plusieurs équipes, suggèrent fortement que les modifications de l'os sous-chondral précèdent ceux du cartilage.

En conclusion, nos résultats ont bel et bien démontré des hypothèses nouvelles dans la compréhension de l'étiologie de l'arthrose. Ces observations vont conduire sûrement à d'autres stratégies pour soigner cette maladie. De plus, la cible de médicaments ne serait pas la même, cette fois-ci l'os devrait être traité si possible au début de la maladie parce que la résorption y est augmentée et au stade avancé, la résorption est diminuée. Les deux systèmes majeurs dans le remodelage osseux, l'uPA/plasmine et l'IGF-1/IGFBPs, sont des cibles potentielles parce que leur traitement conduirait à un remodelage plus normal et empêcherait l'apparition de la sclérose de l'os sous-chondral.

L'exploration de l'os sous-chondral arthrosique ne vient que de commencer. Pour bien comprendre le métabolisme altéré de ce tissu il faut continuer le travail afin de mettre le doigt sur une solution qui ramène à la normale le comportement des ostéoblastes arthrosiques. Pour continuer ce projet de recherche, quelques idées seraient utiles:

- 1) La diminution des IGFBP-3, 4 et 5 est détectée dans les ostéoblastes arthrosiques (Figures R.S.1 et R.S.2). Cette diminution est due en partie à la résistance des

ostéoblastes à la PTH, l'hormone responsable de stimuler leur synthèse. Les protéases de ces protéines liantes jouent un rôle très important dans leurs biodisponibilité. La mesure du niveau et de l'activité de ces protéases sera utile pour mieux comprendre leur implication dans la baisse du niveau des IGFBPs.

- 2) Pour se rapprocher plus de la situation *in vivo*, une coculture d'ostéoblastes normaux et arthrosiques avec des explants de cartilage normaux et arthrosiques serait nécessaire pour comprendre le rôle de l'os sous-chondral dans la dégradation du cartilage. Cette observation est déjà notée *in vivo* chez le modèle animal (Saied et al, 1997) et *in vitro* chez l'humain (Westacott et al, 1997). L'activité et le niveau des métalloprotéases dans le cartilage ainsi que le taux de dégradation du cartilage seront mesurés avant et après l'inhibition de l'activité basale de l'uPA qui est déjà élevée dans les ostéoblastes arthrosiques. L'uPA est une protéase à sérine responsable, en partie, de l'activation des enzymes cataboliques dans la matrice cartilagineuse et osseuse.

Nos travaux ayant démontré que le remodelage osseux défectueux dans l'os arthrosique est le reflet d'un dérèglement des ostéoblastes, et qu'en particulier trois systèmes sont affectés par cette pathologie, ceci nous permet, dans un premier temps, de proposer une thérapie combinée de la PTH avec l'anticorps contre le récepteur à l'IGF-1 chez un modèle animal arthrosique (spontané ou induit par chirurgie). Cette thérapie aurait probablement un effet bénéfique pour les raisons suivantes: i) l'anticorps contre le récepteur à l'IGF-1 augmentera le nombre de récepteurs à la PTH et diminuera l'effet inhibiteur de l'IGF-1 sur le système uPA/plasmine permettant ainsi un remodelage plus normal de la matrice osseuse, ii) la PTH à son tour pourra augmenter la résorption osseuse et diminuera la sclérose de l'os sous-chondral pour réduire l'os à son épaisseur

normale Si nos conclusions sont correctes, ainsi que ceux d'une poignée d'équipes qui travaillent dans des domaines similaires, cette réduction de la sclérose osseuse devrait permettre de réduire l'évolution et/ou stopper l'apparition de l'arthrose. Si les travaux chez l'animal s'avèrent satisfaisants, ceci pourrait alors permettre d'envisager l'utilisation de cette approche chez l'humain.

Références

- Ala-Kokko, L.; Baldwin, C. T.; Moskowitz, R. W., and Prockop, D. J. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Sep; 87(17):6565-8.
- Allan, E. H.; Hamilton, J. A.; Medcalf, R. L.; Kubota, M., and Martin, T. J. Cyclic AMP-dependent and -independent effects on tissue-type plasminogen activator activity in osteogenic sarcoma cells; evidence from phosphodiesterase inhibition and parathyroid hormone antagonists. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Sep 19; 888(2):199-207.
- Allan, E. H.; Zeheb, R.; Gelehrter, T. D.; Heaton, J. H.; Fukumoto, S.; Yee, J. A., and Martin, T. J. Transforming growth factor beta inhibits plasminogen activator (PA) activity and stimulates production of urokinase-type PA, PA inhibitor-1 mRNA, and protein in rat osteoblast-like cells. *J Cell Physiol*. 1991 Oct; 149(1):34-43.
- Amir, G.; Pirie, C. J.; Rashad, S., and Revell, P. A. Remodelling of subchondral bone in osteoarthritis: a histomorphometric study. *J Clin Pathol*. 1992 Nov; 45(11):990-2.
- Anderson, J. J. and Felson, D. T. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol*. 1988 Jul; 128(1):179-89.
- Arner, E. C.; Decicco, C. P.; Cherney, R., and Tortorella, M. D. Cleavage of native cartilage aggrecan by neutrophil collagenase (MMP-8) is distinct from endogenous cleavage by aggrecanase. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4; 272(14):9294-9.
- Arner, E. C.; Pratta, M. A.; Trzaskos, J. M.; Decicco, C. P., and Tortorella, M. D. Generation and characterization of aggrecanase. A soluble, cartilage-derived aggrecan-degrading activity. *J Biol Chem*. 1999 Mar 5; 274(10):6594-601.
- Astrom, J. and Beertema, J. Reduced risk of hip fracture in the mothers of patients with osteoarthritis of the hip. *J Bone Joint Surg [Br]*. 1992 Mar; 74(2):270-1.
- Bachmann, F. Fibrinolysis. In: Verstraete (ed). *Thrombosis and Haemostasis*. Leuven University Press. 1987: 227-265.
- Baird, D. K.; Hathcock, J. T.; Kincaid, S. A.; Rumph, P. F.; Kammermann, J.; Widmer, W. R.; Visco, D., and Sweet, D. Low-field magnetic resonance imaging of early subchondral cyst-like lesions in induced cranial cruciate ligament deficient dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 1998 May-1998 Jun 30; 39(3):167-73.
- Bayliss, M. Metabolism of animal and human osteoarthritic cartilage. Kuettner, K.; Schleyerbach, R., and Peyron, J. *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York : Raven Press; 1992; pp. 487-500.
- Belmonte-Serrano, M. A.; Bloch, D. A.; Lane, N. E.; Michel, B. E., and Fries, J. F. The

relationship between spinal and peripheral osteoarthritis and bone density measurements. *J Rheumatol.* 1993 Jun; 20(6):1005-13.

Beresford, J. N.; Gallagher, J. A., and Russell, R. G. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and human bone-derived cells in vitro: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology.* 1986 Oct; 119(4):1776-85.

Bichell, D. P.; Rotwein, P., and McCarthy, T. L. Prostaglandin E2 rapidly stimulates insulin-like growth factor-I gene expression in primary rat osteoblast cultures: evidence for transcriptional control. *Endocrinology.* 1993 Sep; 133(3):1020-8.

Blasi, F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays.* 1993 Feb; 15(2):105-11.

Bluestone, R.; Bywaters, E. G.; Hartog, M.; Holt, P. J., and Hyde, S. Acromegalic arthropathy. *Ann Rheum Dis.* 1971 May; 30(3):243-58.

Bonassar, L. J.; Frank, E. H.; Murray, J. C.; Paguio, C. G.; Moore, V. L.; Lark, M. W.; Sandy, J. D.; Wu, J. J.; Eyre, D. R., and Grodzinsky, A. J. Changes in cartilage composition and physical properties due to stromelysin degradation. *Arthritis Rheum.* 1995 Feb; 38(2):173-83.

Bonassar, L. J.; Jeffries, K. A.; Frank, E. H.; Moore, V. L.; Lark, M. W.; Bayne, E. K.; McDonnell, J.; Olszewski, J.; Hagmann, W.; Chapman, K. and others. In vivo effects of stromelysin on the composition and physical properties of rabbit articular cartilage in the presence and absence of a synthetic inhibitor. *Arthritis Rheum.* 1995 Nov; 38(11):1678-86.

Bonassar, L. J.; Jeffries, K. A.; Paguio, C. G., and Grodzinsky, A. J. Cartilage degradation and associated changes in biochemical and electromechanical properties. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1995 Oct; 26638-44.

Briggs, M. D.; Hoffman, S. M.; King, L. M.; Olsen, A. S.; Mohrenweiser, H.; Leroy, J. G.; Mortier, G. R.; Rimoin, D. L.; Lachman, R. S.; Gaines, E. S. and others. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat Genet.* 1995 Jul; 10(3):330-6.

Bullough, P. and Cawston, T. Pathology and biochemistry of osteoarthritis. Doherty, M.(ed) *Osteoarthritis.* London University Press. 1994; pp. 29-58.

Burr, D. B. and Schaffler, M. B. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech.* 1997 May 15; 37(4):343-57.

Campbell, P. G.; Novak, J. F.; Yanosick, T. B., and McMaster, J. H. Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology.* 1992 Mar; 130(3):1401-12.

Canalis, E.; McCarthy, T., and Centrella, M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest.* 1988 Feb; 81(2):277-81.

Canalis, E.; McCarthy, T. L., and Centrella, M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1989 Dec; 18(4):903-18.

Carlson, C. S.; Loeser, R. F.; Jayo, M. J.; Weaver, D. S.; Adams, M. R., and Jerome, C. P. Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease. *J Orthop Res.* 1994 May; 12(3):331-9.

Carlson, C. S.; Loeser, R. F.; Purser, C. B.; Gardin, J. F., and Jerome, C. P. Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J Bone Miner Res.* 1996 Sep; 11(9):1209-17.

Carlsson, A.; Nilsson, B. E., and Westlin, N. E. Bone mass in primary coxarthrosis. *Acta Orthop Scand.* 1979 Apr; 50(2):187-9.

Carney, S. L.; Billingham, M. E.; Caterson, B.; Ratcliffe, A.; Bayliss, M. T.; Hardingham, T. E., and Muir, H. Changes in proteoglycan turnover in experimental canine osteoarthritic cartilage. *Matrix.* 1992 Apr; 12(2):137-47.

Caterson, B. and Hughes, C. anabolic and catabolic markers of proteoglycan metabolism in arthritis. Kuettner, K. and Goldberg, V. *Osteoarthritic Disorders.* American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994; pp. 315-327.

Chambers, T. J.; Darby, J. A., and Fuller, K. Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res.* 1985; 241(3):671-5.

Chambers, T. J. and Dunn, C. J. The effect of parathyroid hormone, 1,25-dihydroxycholecalciferol and prostaglandins on the cytoplasmic activity of isolated osteoclasts. *J Pathol.* 1982 Jul; 137(3):193-203.

Chambers, T. J. and Fuller, K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci.* 1985 Jun; 76:155-65.

Chan, C. C.; DiBattista, J. A.; Zhao, J.; Pelletier, J-P.; Martel-Pelletier, J.; Kennedy, B. P.; Brideau, C., and Rodger, I. W. Induction of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human articular chondrocytes and inhibition of PGE2 synthesis by a selective COX-2 inhibitor. 1995; 44, S275.

Cheng, S. L.; Shen, V., and Peck, W. A. Regulation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor production by growth factors and cytokines in rat calvarial cells. *Calcif Tissue Int.* 1991 Nov; 49(5):321-7.

Christiansen, C.; Christensen, M. S., and Transbol, I. Bone mass after withdrawal of oestrogen replacement [letter]. *Lancet.* 1981 May 9; 1(8228):1053-4.

Conrozier, T.; Saxne, T.; Fan, C. S.; Mathieu, P.; Tron, A. M.; Heinegard, D., and Vignon, E. Serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein in hip osteoarthritis: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis.* 1998 Sep; 57(9):527-32.

Cooper, C. Osteoarthritis epidemiology. Klippel, J. and Dieppe, P. (eds). In

Rheumatology. London: Mobsy; 1994; pp. 731-734.

Cooper, C.; Cook, P. L.; Osmond, C.; Fisher, L., and Cawley, M. I. Osteoarthritis of the hip and osteoporosis of the proximal femur. *Ann Rheum Dis.* 1991 Aug; 50(8):540-2.

Cs-Szabo, G.; Roughley, P. J.; Plaas, A. H., and Glant, T. T. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 1995 May; 38(5):660-8.

Cush, J. J. and Lipsky, P. E. Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Oct; 31(10):1230-8.

Dano, K.; Andreasen, P. A.; Grondahl-Hansen, J.; Kristensen, P.; Nielsen, L. S., and Skriver, L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res.* 1985; 44:139-266.

De Seze, S.; Renier, J. C., and Rakic, P. Arthrose vertébrale et osteoporose. *Rev. Rhum.* 1962; 29, 237.

Dean, D. D.; Martel-Pelletier, J.; Pelletier, J. P.; Howell, D. S., and Woessner, J. F. Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1989 Aug; 84(2):678-85.

Dedrick, D. K.; Goldstein, S. A.; Brandt, K. D.; O'Connor, B. L.; Goulet, R. W., and Albrecht, M. A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum.* 1993 Oct; 36(10):1460-7.

Delany, A. M. and Canalis, E. Transcriptional repression of insulin-like growth factor I by glucocorticoids in rat bone cells. *Endocrinology.* 1995 Nov; 136(11):4776-81.

Denko, C. W.; Boja, B., and Moskowitz, R. W. Growth promoting peptides in osteoarthritis: insulin, insulin-like growth factor-1, growth hormone [see comments]. *J Rheumatol.* 1990 Sep; 17(9):1217-21. Notes: COMMENTS: Comment in: *J Rheumatol* 1991 Jun;18(6):937

Dequeker, J. Bone and ageing. *Ann Rheum Dis.* 1975 Feb; 34(1):100-15.

Dequeker, J. Rhumatic disease in visual arts: general review. Appelboom T. (ed). In: *History and Antiquity of rhumatic disease.* Belgium: Elsevier; 1987; pp. 663-667.

Dequeker, J.; Burssens, A., and Bouillon, R. Dynamics of growth hormone secretion in patients with osteoporosis and in patients with osteoarthrosis. *Horm Res.* 1982; 16(6):353-6.

Dequeker, J.; Burssens, A.; Creytens, G., and Bouillon, R. Ageing of bone: its relation to osteoporosis and osteoarthrosis in post- menopausal women. *Front Horm Res.* 1975; 3:116-30.

Dequeker, J.; Gautama, K., and Roh, Y. S. Femoral trabecular patterns in asymptomatic spinal osteoporosis and femoral neck fracture. *Clin Radiol.* 1974 Apr; 25(2):243-6.

Dequeker, J.; Goris, P., and Uytterhoeven, R. Osteoporosis and osteoarthritis (osteoarthrosis). Anthropometric distinctions. *JAMA.* 1983 Mar 18; 249(11):1448-51.

Dequeker, J. and Johnell, O. Osteoarthritis protects against femoral neck fracture: the MEDOS study experience. *Bone.* 1993; 14 Suppl 1S51-6.

Dequeker, J.; Lenaerts, J., and Bouillon, R. Alteration growth factor/IGF axis in osteoarthritis. *Clin. Rheum.* 1994; 13, 163.

Dequeker, J.; Mohan, S.; Finkelman, R. D.; Aerssens, J., and Baylink, D. J. Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis. *Arthritis Rheum.* 1993 Dec; 36(12):1702-8.

Dequeker, J. and Westhovens, R. Distinction between initiation and progression of the osteoarthritis process [letter; comment]. *Ann Rheum Dis.* 1994 May; 53(5):356.

Dieppe, P. Osteoarthritis: the scale and scope of the clinical problem. Dieppe, P. (ed). In: *Osteoarthritis: Current research and prospects for pharmacological intervention.* London: Mobsy; 1991.

Dieppe, P.; Heywood, A.; Rogers, J.; Waldron, T., and Watt, I. The paleopathology of rheumatic diseases. In: *History and Antiquity of Rheumatic Diseases.* Belgium: Elsevier; 1987; p. 111.

Ding, M.; Dalstra, M.; Linde, F., and Hvid, I. Changes in the stiffness of the human tibial cartilage-bone complex in early-stage osteoarthrosis. *Acta Orthop Scand.* 1998 Aug; 69(4):358-62.

Dougados, M.; Gueguen, A.; Nguyen, M.; Berdah, L.; Lequesne, M.; Mazieres, B., and Vignon, E. Radiographic features predictive of radiographic progression of hip osteoarthritis. *Rev Rhum Engl Ed.* 1997 Dec; 64(12):795-803.

Ducy, P.; Desbois, C.; Boyce, B.; Pinero, G.; Story, B.; Dunstan, C.; Smith, E.; Bonadio, J.; Goldstein, S.; Gundberg, C.; Bradley, A., and Karsenty, G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996 Aug 1; 382(6590):448-52.

Eeckhout, Y. and Vaes, G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J.* 1977 Jul 15; 166(1):21-31.

Ernst, M. and Froesch, E. R. Osteoblastlike cells in a serum-free methylcellulose medium form colonies: effects of insulin and insulinlike growth factor I. *Calcif Tissue Int.* 1987 Jan; 40(1):27-34.

Ettinger, W. H. Jr; Burns, R.; Messier, S. P.; Applegate, W.; Rejeski, W. J.; Morgan, T.;

Shumaker, S.; Berry, M. J.; O'Toole, M.; Monu, J., and Craven, T. A randomized trial comparing aerobic exercise and resistance exercise with a health education program in older adults with knee osteoarthritis. The Fitness Arthritis and Seniors Trial (FAST) [see comments]. *JAMA*. 1997 Jan 1; 277(1):25-31.

Evans, D. B.; Bunning, R. A., and Russell, R. G. The effects of recombinant human interleukin-1 beta on cellular proliferation and the production of prostaglandin E2, plasminogen activator, osteocalcin and alkaline phosphatase by osteoblast-like cells derived from human bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Jan 15; 166(1):208-16.

Farley, J. R.; Tarbaux, N.; Murphy, L. A.; Masuda, T., and Baylink, D. J. In vitro evidence that bone formation may be coupled to resorption by release of mitogen(s) from resorbing bone. *Metabolism*. 1987 Apr; 36(4):314-21.

Fawthrop, F. W.; Oyajobi, B. O.; Bunning, R. A., and Russell, R. G. The effect of transforming growth factor beta on the plasminogen activator activity of normal human osteoblast-like cells and a human osteosarcoma cell line MG-63. *J Bone Miner Res*. 1992 Dec; 7(12):1363-71.

Felson, D. T. Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiol Rev*. 1988; 101-28.

Felson, D.T. The course of osteoarthritis and factors that affect it. *Rheum Dis Clin North Am*. 1993 Aug; 19(3):607-15.

Felson, D. T.; Anderson, J. J.; Naimark, A.; Hannan, M. T.; Kannel, W. B., and Meenan, R. F. Does smoking protect against osteoarthritis? *Arthritis Rheum*. 1989 Feb; 32(2):166-72.

Felson, D. T.; Anderson, J. J.; Naimark, A.; Walker, A. M., and Meenan, R. F. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1988 Jul 1; 109(1):18-24.

Felson, D. T.; Hannan, M. T.; Naimark, A.; Berkeley, J.; Gordon, G.; Wilson, P. W., and Anderson, J. Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study [see comments]. *J Rheumatol*. 1991 Oct; 18(10):1587-92.

Felson, D. T.; Zhang, Y.; Anthony, J. M.; Naimark, A., and Anderson, J. J. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study [see comments]. *Ann Intern Med*. 1992 Apr 1; 116(7):535-9.

Felson, D. T.; Zhang, Y.; Hannan, M. T., and Anderson, J. J. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res*. 1993 May; 8(5):567-73.

Fibbi, G.; Ziche, M.; Morbidelli, L.; Magnelli, L., and Del Rosso, M. Interaction of urokinase with specific receptors stimulates mobilization of bovine adrenal capillary endothelial cells [published erratum appears in *Exp Cell Res* 1990 Jan;186(1):196]. *Exp Cell Res*. 1988 Dec; 179(2):385-95.

Flaumenhaft, R.; Abe, M.; Mignatti, P., and Rifkin, D. B. Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol.* 1992 Aug; 118(4):901-9.

Fosang, A. J.; Last, K.; Knauper, V.; Neame, P. J.; Murphy, G.; Hardingham, T. E.; Tschesche, H., and Hamilton, J. A. Fibroblast and neutrophil collagenases cleave at two sites in the cartilage aggrecan interglobular domain. *Biochem J.* 1993 Oct 1; 295 (Pt 1)273-6.

Fosang, A. J.; Last, K.; Neame, P. J.; Murphy, G.; Knauper, V.; Tschesche, H.; Hughes, C. E.; Caterson, B., and Hardingham, T. E. Neutrophil collagenase (MMP-8) cleaves at the aggrecanase site E373- A374 in the interglobular domain of cartilage aggrecan. *Biochem J.* 1994 Dec 1; 304 (Pt 2)347-51.

Foss, M. V. and Byers, P. D. Bone density, osteoarthritis of the hip, and fracture of the upper end of the femur. *Ann Rheum Dis.* 1972 Jul; 31(4):259-64.

Fraser, D. R. and Kodicek, E. Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature.* 1970 Nov 21; 228(273):764-6.

Fraser, J. D.; Otawara, Y., and Price, P. A. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the synthesis of matrix gamma- carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. Mutually exclusive expression of vitamin K-dependent bone proteins by clonal osteoblastic cell lines. *J Biol Chem.* 1988 Jan 15; 263(2):911-6.

Fukayama, S.; Schipani, E.; Juppner, H.; Lanske, B.; Kronenberg, H. M.; Abou-Samra, A. B., and Bringham, F. R. Role of protein kinase-A in homologous down-regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology.* 1994 Apr; 134(4):1851-8.

Fukayama, S.; Tashjian, A. H. Jr, and Bringham, F. R. Forskolin-induced homologous desensitization via an adenosine 3',5'- monophosphate-dependent mechanism(s) in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology.* 1992a Oct; 131(4):1770-6.

Fukayama, S.; Tashjian, A. H. Jr, and Bringham, F. R. Mechanisms of desensitization to parathyroid hormone in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology.* 1992b Oct; 131(4):1757-69.

Fukumoto, S.; Allan, E. H., and Martin, T. J. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression by 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in normal and malignant rat osteoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Nov 11; 1201(2):223-8.

Fukumoto, S.; Allan, E. H.; Yee, J. A.; Gelehrter, T. D., and Martin, T. J. Plasminogen activator regulation in osteoblasts: parathyroid hormone inhibition of type-1 plasminogen activator inhibitor and its mRNA. *J Cell Physiol.* 1992 Aug; 152(2):346-55.

Fukumoto, S.; Allan, E. H.; Zeheb, R.; Gelehrter, T. D., and Martin, T. J. Glucocorticoid regulation of plasminogen activator inhibitor-1 messenger ribonucleic acid and protein in normal and malignant rat osteoblasts. *Endocrinology.* 1992 Feb; 130(2):797-804.

- Geusens, P.; Dequeker, J., and Verstraeten, A. Age-related blood changes in hip osteoarthritis patients: a possible indicator of bone quality [letter]. *Ann Rheum Dis.* 1983 Feb; 42(1):112-3.
- Geusens, P.; Vanderschueren, D.; Verstraeten, A.; Dequeker, J.; Devos, P., and Bouillon, R. Short-term course of 1,25(OH)₂D₃ stimulates osteoblasts but not osteoclasts in osteoporosis and osteoarthritis. *Calcif Tissue Int.* 1991 Sep; 49(3):168-73.
- Gevers, G. and Dequeker, J. Collagen and non-collagenous protein content (osteocalcin, sialoprotein, proteoglycan) in the iliac crest bone and serum osteocalcin in women with and without hand osteoarthritis. *Coll Relat Res.* 1987 Dec; 7(6):435-42.
- Gevers, G.; Dequeker, J.; Geusens, P.; Devos, P., and De roo, M. Comparison of osteocalcin levels and of bone moneral content at the radius and the spine in primary osteoporosis and primary osteoarthritis. *J. Orth. Rheumatol.*, 1988; 1, 21-27.
- Gevers, G.; Dequeker, J.; Geusens, P.; Nyssen-Behets, C., and Dhem, A. Physical and histomorphological characteristics of iliac crest bone differ according to the grade of osteoarthritis at the hand. *Bone.* 1989; 10(3):173-7.
- Gevers, G.; Dequeker, J.; Martens, M.; Van Audekercke, R.; Nyssen-Behets, C., and Dhem, A. Biomechanical characteristics of iliac crest bone in elderly women according to osteoarthritis grade at the hand joints. *J Rheumatol.* 1989 May; 16(5):660-3.
- Ghadirian, A. M. ageing, Challenges and opportunities. Oxford: George Ronald; 1991; pp. 12-21.
- Goldthwait, J. E. The differential diagnosis and treatment of the so called rheumatoid disease. *Bost. Med. Surg. J.*, 1904; 151, 529-534.
- Gotfredsen, A.; Riis, B. J.; Christiansen, C., and Rodbro, P. Does a single local absorptiometric bone measurement indicate the overall skeletal status? Implications for osteoporosis and osteoarthritis of the hip. *Clin Rheumatol.* 1990 Jun; 9(2):193-203.
- Green, W. T. Jr; Martin, G. N.; Eanes, E. D., and Sokoloff, L. Microradiographic study of the calcified layer of articular cartilage. *Arch Pathol.* 1970 Aug; 90(2):151-8.
- Grynepas, M. D.; Alpert, B.; Katz, I.; Lieberman, I., and Pritzker, K. P. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int.* 1991 Jul; 49(1):20-6.
- Gudewicz, P. W. and Gilboa, N. Human urokinase-type plasminogen activator stimulates chemotaxis of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Sep 30; 147(3):1176-81.
- Guilak, F.; Ratcliffe, A.; Lane, N.; Rosenwasser, M. P., and Mow, V. C. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res.* 1994 Jul; 12(4):474-84.
- Gunzler, W. A.; Steffens, G. J.; Otting, F.; Kim, S. M.; Frankus, E., and Flohe, L. The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete

amino acid sequence of the A chain. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1982 Oct; 363(10):1155-65.

Hamerman, D. and Stanley, E. R. Implications of increased bone density in osteoarthritis. J Bone Miner Res. 1996 Sep; 11(9):1205-8.

Hamilton, J. A.; Lingelbach, S.; Partridge, N. C., and Martin, T. J. Regulation of plasminogen activator production by bone-resorbing hormones in normal and malignant osteoblasts. Endocrinology. 1985 Jun; 116(6):2186-91.

Hamilton, J. A.; Lingelbach, S. R.; Partridge, N. C., and Martin, T. J. Stimulation of plasminogen activator in osteoblast-like cells by bone- resorbing hormones. Biochem Biophys Res Commun. 1984 Jul 18; 122(1):230-6.

Hannan, M. T.; Anderson, J. J.; Pincus, T., and Felson, D. T. Educational attainment and osteoarthritis: differential associations with radiographic changes and symptom reporting. J Clin Epidemiol. 1992 Feb; 45(2):139-47.

Hannan, M. T.; Anderson, J. J.; Zhang, Y.; Levy, D., and Felson, D. T. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women. The Framingham Study. Arthritis Rheum. 1993 Dec; 36(12):1671-80.

Hannan, M. T.; Felson, D. T.; Anderson, J. J., and Naimark, A. Habitual physical activity is not associated with knee osteoarthritis: the Framingham Study. J Rheumatol. 1993 Apr; 20(4):704-9.

Hardingham, T. E.; Bayliss, M. T.; Rayan, V., and Noble, D. P. Effects of growth factors and cytokines on proteoglycan turnover in articular cartilage. Br J Rheumatol. 1992; 31 Suppl 11-6.

Harris, E. D. Jr. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: its relevance to therapy in the '90s. Trans Am Clin Climatol Assoc. 1990a; 102:260-8; discussion 268-70.

Harris, E. D. Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy [published erratum appears in N Engl J Med 1990 Oct 4;323(14):996] [see comments]. N Engl J Med. 1990b May 3; 322(18):1277-89.

Hart, D. J.; Mootoosamy, I.; Doyle, D. V., and Spector, T. D. The relationship between osteoarthritis and osteoporosis in the general population: the Chingford Study. Ann Rheum Dis. 1994 Mar; 53(3):158-62.

Hastbacka, J.; de la Chapelle, A.; Mahtani, M. M.; Clines, G.; Reeve-Daly, M. P.; Daly, M.; Hamilton, B. A.; Kusumi, K.; Trivedi, B.; Weaver, A. and others. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. Cell. 1994 Sep 23; 78(6):1073-87.

Havdrup, T.; Hulth, A., and Telhag, H. The subchondral bone in osteoarthritis and rheumatoid arthritis of the knee. A histological and microradiographical study. Acta Orthop Scand. 1976 Jun; 47(3):345-50.

Heath, J. K.; Atkinson, S. J.; Meikle, M. C., and Reynolds, J. J. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta*. 1984 Nov 6; 802(1):151-4.

Heersche, J. N.; Heyboer, M. P., and Ng, B. Hormone-specific suppression of adenosine 3',5'-monophosphate responses in bone in vitro during prolonged incubation with parathyroid hormone, prostaglandin E1, and calcitonin. *Endocrinology*. 1978 Aug; 103(2):333-40.

Helminen, H.; Jurvelin, J., and Kiviranta, I. Joint loading effects on articular cartilage: A historical review. Helminen, H.; Kiviranta, I., and Tammi, M (eds). In: joint loading. Bristol: wright; 1987; pp. 1-46.

Heyworth, C. M.; Hanski, E., and Houslay, M. D. Islet-activating protein blocks glucagon desensitization in intact hepatocytes. *Biochem J*. 1984 Aug 15; 222(1):189-94.

Hochberg, M. C.; Lethbridge-Cejku, M.; Scott, W. W. Jr; Reichle, R.; Plato, C. C., and Tobin, J. D. Serum levels of insulin-like growth factor in subjects with osteoarthritis of the knee. Data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Arthritis Rheum*. 1994 Aug; 37(8):1177-80.

Hock, J. M.; Centrella, M., and Canalis, E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*. 1988 Jan; 122(1):254-60.

Hoekman, K.; Lowik, C. W.; v.d. Ruit, M.; Bijvoet, O. L.; Verheijen, J. H., and Papapoulos, S. E. Regulation of the production of plasminogen activators by bone resorption enhancing and inhibiting factors in three types of osteoblast-like cells. *Bone Miner*. 1991 Sep; 14(3):189-204.

Hordon, L. D.; Stewart, S. P.; Troughton, P. R.; Wright, V.; Horsman, A., and Smith, M. A. Primary generalized osteoarthritis and bone mass. *Br J Rheumatol*. 1993 Dec; 32(12):1059-61.

Howell, D. S.; Muller, F., and Manicourt, D. H. A mini review: proteoglycan aggregate profiles in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis and in canine disuse atrophy. *Br J Rheumatol*. 1992; 31 Suppl 17-11.

Hughes, C.; Caterson, B., and Fosang, A. Production of monoclonal antibodies that specifically recognise neopeptide sequences generated by aggrecanase and matrix metalloproteinase catabolism of aggrecan. *Trans. Ortop. Res. Soc.*, 1994; 19, 311.

Hughes, C. E.; Little, C. B.; Buttner, F. H.; Bartnik, E., and Caterson, B. Differential expression of aggrecanase and matrix metalloproteinase activity in chondrocytes isolated from bovine and porcine articular cartilage. *J Biol Chem*. 1998 Nov 13; 273(46):30576-82.

Ilic, M. Z.; Handley, C. J.; Robinson, H. C., and Mok, M. T. Mechanism of catabolism of aggrecan by articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*. 1992 Apr; 294(1):115-22.

Janossy, G.; Panayi, G.; Duke, O.; Bofill, M.; Poulter, L. W., and Goldstein, G. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet*. 1981 Oct 17; 2(8251):839-42.

Kadler, K. Extracellular matrix. 1: fibril-forming collagens. *Protein Profile*. 1994; 1(5):519-638.

Kasai, S.; Arimura, H.; Nishida, M., and Suyama, T. Proteolytic cleavage of single-chain pro-urokinase induces conformational change which follows activation of the zymogen and reduction of its high affinity for fibrin. *J Biol Chem*. 1985 Oct 5; 260(22):12377-81.

Kawane, T. and Horiuchi, N. Insulin-like growth factor I suppresses parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor expression via a mitogen-activated protein kinase pathway in UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology*. 1999 Feb; 140(2):871-9.

Kempson, G. Mechanical properties of articular cartilage. Freeman, M (ed). *Adult Articular Cartilage*. Kent: Pitman Medical Publishers; 1979; pp. 333-414.

Kent, G. N.; Jilka, R. L., and Cohn, D. V. Homologous and heterologous control of bone cell adenosine 3',5'- monophosphate response to hormones by parathormone, prostaglandin E2, calcitonin, and 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Endocrinology*. 1980 Nov; 107(5):1474-81.

Kirchick, H. J.; Iyengar, R., and Birnbaumer, L. Human chorionic gonadotropin-induced heterologous desensitization of adenylyl cyclase from highly luteinized rat ovaries: attenuation of regulatory N component activity. *Endocrinology*. 1983 Nov; 113(5):1638-46.

Knowlton, R. G.; Katzenstein, P. L.; Moskowitz, R. W.; Weaver, E. J.; Malesud, C. J.; Pathria, M. N.; Jimenez, S. A., and Prockop, D. J. Genetic linkage of a polymorphism in the type II procollagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia. *N Engl J Med*. 1990 Feb 22; 322(8):526-30.

Krane, S. Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. Greenwald, R. and Golub, L. *Inhibition of Matrix Metalloproteinases*. Tampa: New York Academy of Sciences; 1994; pp. 1-10.

Kujala, U. M.; Kettunen, J.; Paananen, H.; Aalto, T.; Battie, M. C.; Impivaara, O.; Videman, T., and Sarna, S. Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis Rheum*. 1995 Apr; 38(4):539-46.

Lalou, C.; Silve, C.; Rosato, R.; Segovia, B., and Binoux, M. Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF-binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells. *Endocrinology*. 1994 Dec; 135(6):2318-26.

Lambert, P. W.; Stern, P. H.; Avioli, R. C.; Brackett, N. C.; Turner, R. T.; Greene, A.; Fu, I. Y., and Bell, N. H. Evidence for extrarenal production of 1 alpha ,25-dihydroxyvitamin D in man. *J Clin Invest*. 1982 Mar; 69(3):722-5.

Lane, N. E. and Nevitt, M. C. Osteoarthritis and bone mass [editorial]. *J Rheumatol.* 1994 Aug; 21(8):1393-6.

Lark, M. W.; Bayne, E. K.; Flanagan, J.; Harper, C. F.; Hoerrner, L. A.; Hutchinson, N. I.; Singer, I. I.; Donatelli, S. A.; Weidner, J. R.; Williams, H. R.; Mumford, R. A., and Lohmander, L. S. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1; 100(1):93-106.

Laschinger, C. A.; Bellows, C. G., and Wasi, S. Modulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors by TGF-beta, IL-1 alpha and EGF in fetal rat calvaria cells at different times of culture. *Bone Miner.* 1991 Apr; 13(1):23-34.

Layton, M. W.; Goldstein, S. A.; Goulet, R. W.; Feldkamp, L. A.; Kubinski, D. J., and Bole, G. G. Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography. *Arthritis Rheum.* 1988 Nov; 31(11):1400-5.

Li, B. and Aspden, R. M. Material properties of bone from the femoral neck and calcar femorale of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Osteoporos Int.* 1997a; 7(5):450-6.

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

Li, B. and Aspden, R. M. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis.* 1997c Apr; 56(4):247-54.

Littlejohn, G. O.; Hall, S.; Brand, C. A., and Davidson, A. New bone formation in acromegaly: pathogenetic implications for diffuse idiopathic skeletal hyperostosis. *Clin Exp Rheumatol.* 1986 Apr-1986 Jun 30; 4(2):99-104.

Lohmander, L. S.; Neame, P. J., and Sandy, J. D. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1993 Sep; 36(9):1214-22.

Lorig, K. and Fries, J. *L'Arthrodidacte*. Adaptation française: Denis Choquette. *L'Arthrodidacte*. Ottawa: Renouveau Pédagogique Inc.; 1991.

Loughlin, J.; Irvén, C.; Fergusson, C., and Sykes, B. Sibling pair analysis shows no linkage of generalized osteoarthritis to the loci encoding type II collagen, cartilage link protein or cartilage matrix protein. *Br J Rheumatol.* 1994 Dec; 33(12):1103-6.

Lyons, R. M.; Gentry, L. E.; Purchio, A. F., and Moses, H. L. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol.* 1990 Apr; 110(4):1361-7.

MacDonald, B. R.; Gallagher, J. A.; Ahnfelt-Ronne, I.; Beresford, J. N.; Gowen, M., and

Russell, R. G. Effects of bovine parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the production of prostaglandins by cells derived from human bone. *FEBS Lett.* 1984 Apr 9; 169(1):49-52.

Madsen, O. R.; Schaadt, O.; Bliddal, H.; Egsmose, C., and Sylvest, J. Bone mineral distribution of the proximal tibia in gonarthrosis assessed in vivo by photon absorption. *Osteoarthritis Cartilage*, 1994; 2, (141-147).

Mansell, J. P. and Bailey, A. J. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest.* 1998 Apr 15; 101(8):1596-603.

Marcelli, C.; Favier, F.; Kotzki, P. O.; Ferrazzi, V.; Picot, M. C., and Simon, L. The relationship between osteoarthritis of the hands, bone mineral density, and osteoporotic fractures in elderly women. *Osteoporos Int.* 1995; 5(5):382-8.

Marcotte, P. A.; Henkin, J.; Credo, R. B., and Badylak, S. F. A-Chain isozymes of recombinant and natural Urokinases: Preparation, Characterization, and their Biochemical and Fibrinolytic Properties. *Fibrinolysis*, 1992; 6, 69-78.

Marder, V. J. and Sherry, S. Thrombolytic therapy: current status (2). *N Engl J Med.* 1988 Jun 16; 318(24):1585-95.

Martel-Pelletier, J.; Hilal, G.; Pelletier, J-P.; Ranger, P., and Lajeunesse, D. Evidence for increased metabolic activity in human osteoarthritic subchondral bone explants. 1997; American College of Rheumatology. Washington, DC, USA.

Martin, T. J.; Allan, E. H., and Fukumoto, S. The plasminogen activator and inhibitor system in bone remodelling. *Growth Regul.* 1993 Dec; 3(4):209-14.

Mathey, D. G.; Schofer, J., and Sheehan, F. H. Coronary thrombolysis with intravenous urokinase in patients with acute myocardial infarction. *Am J Med.* 1987 Aug 24; 83(2A):26-30.

Matsui, H.; Shimizu, M., and Tsuji, H. Cartilage and subchondral bone interaction in osteoarthritis of human knee joint: a histological and histomorphometric study. *Microsc Res Tech.* 1997 May 15; 37(4):333-42.

McAlindon, T. E.; Teal, D., and Dieppe, P. A. Insuline-like growth factor 1: Effect of age accounts for apparent correlation with sclerosis and osteophytosis in osteoarthritis of the knee (abstract). *Arth. Rheum. (sup)*, 1992; 31, 213.

McGibbon, C. A.; Dupuy, D. E.; Palmer, W. E., and Krebs, D. E. Cartilage and subchondral bone thickness distribution with MR imaging. *Acad Radiol.* 1998 Jan; 5(1):20-5.

Merke, J.; Klaus, G.; Hugel, U.; Waldherr, R., and Ritz, E. No 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors on osteoclasts of calcium- deficient chicken despite demonstrable receptors on circulating monocytes. *J Clin Invest.* 1986 Jan; 77(1):312-4.

Mitchell, J. and Goltzman, D. Mechanisms of homologous and heterologous regulation of

parathyroid hormone receptors in the rat osteosarcoma cell line UMR-106. *Endocrinology*. 1990 May; 126(5):2650-60.

Mohan, S.; Linkhart, T.; Jennings, J., and Baylink, D. Chemical and biological characterization of low-molecular-weight human skeletal growth factor. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Nov 19; 884(2):243-50.

Mokassa B.; Dequeker, J.; Raymaekers, G., and Aerssen, J. Effect of osteoarthritis and body weight on subchondral cancellous bone quality of proximal tibia. *Osteoarthritis Cartilage*, 1993; 1, 55-56.

Moore, R. J.; Fazzalari, N. L.; Manthey, B. A., and Vernon-Roberts, B. The relationship between head-neck-shaft angle, calcar width, articular cartilage thickness and bone volume in arthrosis of the hip. *Br J Rheumatol*. 1994 May; 33(5):432-6.

Moskowitz, R. W.; Pun, Y., and Haqqi, T. M. Genetics and osteoarthritis. *Bull Rheum Dis*. 1992; 41(1):4-6.

Mullins, D. E. and Rohrlich, S. T. The role of proteinases in cellular invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Dec 29; 695(3-4):177-214.

Muragaki, Y.; Mariman, E. C.; van Beersum, S. E.; Perala, M.; van Mourik, J. B.; Warman, M. L.; Olsen, B. R., and Hamel, B. C. A mutation in the gene encoding the alpha 2 chain of the fibril-associated collagen IX, COL9A2, causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Nat Genet*. 1996 Jan; 12(1):103-5.

Narbaitz, R.; Stumpf, W. E.; Sar, M.; Huang, S., and DeLuca, H. F. Autoradiographic localization of target cells for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in bones from fetal rats. *Calcif Tissue Int*. 1983; 35(2):177-82.

Neuhaus, K. L.; Tebbe, U.; Gottwik, M.; Weber, M. A.; Feuerer, W.; Niederer, W.; Haerer, W.; Praetorius, F.; Grosser, K. D.; Huhmann, W. and others. Intravenous recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) and urokinase in acute myocardial infarction: results of the German Activator Urokinase Study (GAUS). *J Am Coll Cardiol*. 1988 Sep; 12(3):581-7.

Nevitt, M. C.; Lane, N. E.; Scott, J. C.; Hochberg, M. C.; Pressman, A. R.; Genant, H. K., and Cummings, S. R. Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum*. 1995 Jul; 38(7):907-16.

Nevitt, M. C.; Scott, J. C., and Lane, N. E. Hip osteoarthritis and bone mineral density in older white women (Abstract). *Arth. Rheum.*, 1992; 35, s42.

Oettmeier, R.; Arokoski, J.; Roth, A. J.; Helminen, H. J.; Tammi, M., and Abendroth, K. Quantitative study of articular cartilage and subchondral bone remodeling in the knee joint of dogs after strenuous running training. *J Bone Miner Res*. 1992 Dec; 7 Suppl 2S419-24.

Okada, Y.; Shinmei, M.; Tanaka, O.; Naka, K.; Kimura, A.; Nakanishi, I.; Bayliss, M. T.;

Iwata, K., and Nagase, H. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest.* 1992 Jun; 66(6):680-90.

Panula, H. E.; Nieminen, J.; Parkkinen, J. J.; Arnala, I.; Kroger, H., and Alhava, E. Subchondral bone remodeling increases in early experimental osteoarthritis in young beagle dogs. *Acta Orthop Scand.* 1998 Dec; 69(6):627-32.

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

Partridge, N. C.; Jeffrey, J. J.; Ehlich, L. S.; Teitelbaum, S. L.; Fliszar, C.; Welgus, H. G., and Kahn, A. J. Hormonal regulation of the production of collagenase and a collagenase inhibitor activity by rat osteogenic sarcoma cells. *Endocrinology.* 1987 May; 120(5):1956-62.

Pennica, D.; Holmes, W. E.; Kohr, W. J.; Harkins, R. N.; Vehar, G. A.; Ward, C. A.; Bennett, W. F.; Yelverton, E.; Seeburg, P. H.; Heyneker, H. L.; Goeddel, D. V., and Collen, D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature.* 1983 Jan 20; 301(5897):214-21.

Petersson, I. F.; Boegard, T.; Svensson, B.; Heinegard, D., and Saxne, T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol.* 1998 Jan; 37(1):46-50.

Pfeilschifter, J.; Erdmann, J.; Schmidt, W.; Naumann, A.; Minne, H. W., and Ziegler, R. Differential regulation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by osteotropic factors in primary cultures of mature osteoblasts and osteoblast precursors. *Endocrinology.* 1990 Feb; 126(2):703-11.

Pfeilschifter, J.; Krempien, R.; Naumann, A.; Gronwald, R. G.; Hoppe, J., and Ziegler, R. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform-specific receptor functions. *Endocrinology.* 1992 Apr; 130(4):2059-66.

Pincus, T. and Callahan, L. F. What is the natural history of rheumatoid arthritis? *Rheum Dis Clin North Am.* 1993a Feb; 19(1):123-51.

Pincus, T. and Callahan, L. F. The 'side effects' of rheumatoid arthritis: joint destruction, disability and early mortality. *Br J Rheumatol.* 1993b Mar; 32 Suppl 128-37.

Pincus, T. and Callahan, L. F. Depression scales in rheumatoid arthritis: criterion contamination in interpretation of patient responses. *Patient Educ Couns.* 1993c May; 20(2-3):133-43.

Pines, M.; Yosif, B., and Hurwitz, S. Modulation of responsiveness of the adenylate cyclase system in avian chondroprogenitor cells by pertussis toxin, PTH, and PGE₂. *J Bone Miner Res.* 1989 Oct; 4(5):743-50.

Poggrund, H.; Rutenberg, M.; Makin, M.; Robin, G.; Menczel, J., and Steinberg, R. Osteoarthritis of the hip joint and osteoporosis: a radiological study in a random

population sample in Jerusalem. *Clin Orthop*. 1982 Apr; (164):130-5.

Pohl, G.; Kallstrom, M.; Bergsdorf, N.; Wallen, P., and Jornvall, H. Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences. *Biochemistry*. 1984 Jul 31; 23(16):3701-7.

Pollanen, J.; Stephens, R. W., and Vaheri, A. Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells. *Adv Cancer Res*. 1991; 57:273-328.

Poole, A.; Rizkalla, G., and Ionescu, M. Osteoarthritis in Human Knee: A dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. *Osteoarthritis Cartilage*, 1993; 39, 3-13.

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

Price, P. A.; Parthemore, J. G., and Deftos, L. J. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Invest*. 1980 Nov; 66(5):878-83.

Priestley, L.; Fergusson, C.; Ogilvie, D.; Wordsworth, P.; Smith, R.; Patrick, M.; Doherty, M., and Sykes, B. A limited association of generalized osteoarthritis with alleles at the type II collagen locus: COL2A1. *Br J Rheumatol*. 1991 Aug; 30(4):272-5.

Pugh, J. W.; Radin, E. L., and Rose, R. M. Quantitative studies of human subchondral cancellous bone. Its relationship to the state of its overlying cartilage. *J Bone Joint Surg [Am]*. 1974 Mar; 56(2):313-21.

Pun, Y. L.; Moskowitz, R. W.; Lie, S.; Sundstrom, W. R.; Block, S. R.; McEwen, C.; Williams, H. J.; Bleasel, J. F.; Holderbaum, D., and Haqqi, T. M. Clinical correlations of osteoarthritis associated with a single-base mutation (arginine519 to cysteine) in type II procollagen gene. A newly defined pathogenesis. *Arthritis Rheum*. 1994 Feb; 37(2):264-9.

Rabbani, S. A.; Desjardins, J.; Bell, A. W.; Banville, D.; Mazar, A.; Henkin, J., and Goltzman, D. An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Dec 31; 173(3):1058-64.

Rabbani, S. A.; Mazar, A. P.; Bernier, S. M.; Haq, M.; Bolivar, I.; Henkin, J., and Goltzman, D. Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase. *J Biol Chem*. 1992 Jul 15; 267(20):14151-6.

Radin, E. L.; Abernethy, P. J.; Townsend, P. M., and Rose, R. M. The role of bone changes in the degeneration of articular cartilage in osteoarthrosis. *Acta Orthop Belg*. 1978 Jan-1978 Feb 28; 44(1):55-63.

Radin, E. L. and Paul, I. L. Does cartilage compliance reduce skeletal impact loads? The

relative force-attenuating properties of articular cartilage, synovial fluid, periarticular soft tissues and bone. *Arthritis Rheum.* 1970a Mar-1970a Apr 30; 13(2):139-44.

Radin, E. L. and Paul, I. L. Joint function. *Arthritis Rheum.* 1970b May-1970b Jun 30; 13(3):276-9.

Radin, E. L.; Paul, I. L., and Lowy, M. A comparison of the dynamic force transmitting properties of subchondral bone and articular cartilage. *J Bone Joint Surg [Am].* 1970 Apr; 52(3):444-56.

Radin, E. L.; Paul, I. L., and Tolkoff, M. J. Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum.* 1970 Jul-1970 Aug 31; 13(4):400-5.

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

Ranby, M. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Jun 24; 704(3):461-9.

Raymaekers, G.; Aerssens, J.; Van den Eynde, R.; Peeters, J.; Geusens, P.; Devos, P., and Dequeker, J. Alterations of the mineralization profile and osteocalcin concentrations in osteoarthritic cortical iliac crest bone. *Calcif Tissue Int.* 1992 Oct; 51(4):269-75.

Reichel, H.; Koeffler, H. P., and Norman, A. W. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease [see comments]. *N Engl J Med.* 1989 Apr 13; 320(15):980-91.

Ritvaniemi, P.; Korkko, J.; Bonaventure, J.; Vikkula, M.; Hyland, J.; Paassilta, P.; Kaitila, I.; Kaariainen, H.; Sokolov, B. P.; Hakala, M. and others. Identification of COL2A1 gene mutations in patients with chondrodysplasias and familial osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 Jul; 38(7):999-1004.

Rogers, J. Lessons from Paleopathology. *Practitioner.* 1983; 227, 1191-1199.

Roh, Y. S.; Dequeker, J., and Mulier, J. C. Trabecular pattern of the upper end of the femur in primary osteoarthrosis and in symptomatic osteoporosis. *J Belge Radiol.* 1974a Mar-1974a Apr 30; 57(2):89-94.

Roh, Y. S.; Dequeker, J., and Mulier, J. C. Bone mass in osteoarthrosis, measured in vivo by photon absorption. *J Bone Joint Surg [Am].* 1974b Apr; 56(3):587-91.

Rothschild, B. M. and Woods, R. J. Symmetrical erosive disease in Archaic Indians: the origin of rheumatoid arthritis in the New World? *Semin Arthritis Rheum.* 1990 Apr; 19(5):278-84.

Rothschild, B. M.; Woods, R. J., and Ortel, W. Rheumatoid arthritis "in the buff": erosive arthritis in defleshed bones. *Am J Phys Anthropol.* 1990 Aug; 82(4):441-9.

Saied, A.; Cherin, E.; Gaucher, H.; Laugier, P.; Gillet, P.; Floquet, J.; Netter, P., and Berger, G. Assessment of articular cartilage and subchondral bone: subtle and

progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro. *J Bone Miner Res.* 1997 Sep; 12(9):1378-86.

Saksela, O. Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Nov 12; 823(1):35-65.

Samanta, A.; Jones, A.; Regan, M.; Wilson, S., and Doherty, M. Is osteoarthritis in women affected by hormonal changes or smoking? *Br J Rheumatol.* 1993 May; 32(5):366-70.

Sandy, J. D.; Gamett, D.; Thompson, V., and Verscharen, C. Chondrocyte-mediated catabolism of aggrecan: aggrecanase-dependent cleavage induced by interleukin-1 or retinoic acid can be inhibited by glucosamine. *Biochem J.* 1998 Oct 1; 335 (Pt 1)59-66.

Sandy, J. D.; Neame, P. J.; Boynton, R. E., and Flannery, C. R. Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J Biol Chem.* 1991 May 15; 266(14):8683-5.

Sasahara, A. A.; Cannilla, J. E.; Belko, J. S.; Morse, R. L., and Criss, A. J. Urokinase therapy in clinical pulmonary embolism. A new thrombolytic agent. *N Engl J Med.* 1967 Nov 30; 277(22):1168-73.

Sato, Y. and Rifkin, D. B. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol.* 1989 Jul; 109(1):309-15.

Sato, Y.; Tsuboi, R.; Lyons, R.; Moses, H., and Rifkin, D. B. Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol.* 1990 Aug; 111(2):757-63.

Schneider, P.; Bachmann, F., and Sauser, D. Urokinase. A short review of its properties and of its metabolism. *Urokinase:Basic and Clinical Aspects.* Academic Press, New York 1-15; 1982.

Schouten, J. S.; Van den Ouweland, F. A.; Valkenburg, H. A., and Lamberts, S. W. Insulin-like growth factor-1: a prognostic factor of knee osteoarthritis. *Br J Rheumatol.* 1993 Apr; 32(4):274-80.

Setton, L. A.; Mow, V. C., and Howell, D. S. Mechanical behavior of articular cartilage in shear is altered by transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 1995 Jul; 13(4):473-82.

Shiang, R.; Thompson, L. M.; Zhu, Y. Z.; Church, D. M.; Fielder, T. J.; Bocian, M.; Winokur, S. T., and Wasmuth, J. J. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell.* 1994 Jul 29; 78(2):335-42.

Simon, S. R.; Radin, E. L.; Paul, I. L., and Rose, R. M. The response of joints to impact loading. II. In vivo behavior of subchondral bone. *J Biomech.* 1972 May; 5(3):267-72.

Slemenda, C.; Brandt, K. D.; Heilman, D. K.; Mazzuca, S.; Braunstein, E. M.; Katz, B. P., and Wolinsky, F. D. Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. *Ann Intern Med.* 1997 Jul 15; 127(2):97-104.

Slemenda C; , Brandt KD; , Heilman DK, and , Katz B. A randomized trial comparing aerobic exercise and resistance exercise in pain and in functional impairment in knee osteoarthritis (abstract). *Arth. Rheum.*, 1997; 39, S212.

Sowers, M. F.; Hochberg, M.; Crabbe, J. P.; Muhich, A.; Crutchfield, M., and Updike, S. Association of bone mineral density and sex hormone levels with osteoarthritis of the hand and knee in premenopausal women. *Am J Epidemiol.* 1996 Jan 1; 143(1):38-47.

Spector, T. D.; Harris, P. A.; Hart, D. J.; Cicuttini, F. M.; Nandra, D.; Etherington, J.; Wolman, R. L., and Doyle, D. V. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum.* 1996 Jun; 39(6):988-95.

Stephens, M.; Kwan, A. P.; Bayliss, M. T., and Archer, C. W. Human articular surface chondrocytes initiate alkaline phosphatase and type X collagen synthesis in suspension culture. *J Cell Sci.* 1992 Dec; 103 (Pt 4)1111-6.

Stougaard, J. The calcified cartilage and the subchondral bone under normal and abnormal conditions. *Acta Pathol Microbiol Scand [A].* 1974 Mar; 82(2):182-8.

Strassburger, W.; Wollmer, A.; Pitts, J. E.; Glover, I. D.; Tickle, I. J.; Blundell, T. L.; Steffens, G. J.; Gunzler, W. A.; Otting, F., and Flohe, L. Adaptation of plasminogen activator sequences to known protease structures. *FEBS Lett.* 1983 Jul 4; 157(2):219-23.

Teitelbaum, A. P.; Nissenson, R. A.; Zitzner, L. A., and Simon, K. Dual regulation of PTH-stimulated adenylate cyclase activity by GTP. *Am J Physiol.* 1986 Nov; 251(5 Pt 2):F858-64.

Teitelbaum, A. P.; Silve, C. M.; Nyireddy, K. O., and Arnaud, C. D. Down-regulation of parathyroid hormone (PTH) receptors in cultured bone cells is associated with agonist-specific intracellular processing of PTH-receptor complexes. *Endocrinology.* 1986 Feb; 118(2):595-602.

Thiebaud, D.; Ng, K. W.; Findlay, D. M.; Harker, M., and Martin, T. J. Insulinlike growth factor 1 regulates mRNA levels of osteonectin and pro-alpha 1(I)-collagen in clonal preosteoblastic calvarial cells. *J Bone Miner Res.* 1990 Jul; 5(7):761-7.

Thomson, B. M.; Atkinson, S. J.; McGarrity, A. M.; Hembry, R. M.; Reynolds, J. J., and Meikle, M. C. Type I collagen degradation by mouse calvarial osteoblasts stimulated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3: evidence for a plasminogen-plasmin- metalloproteinase activation cascade. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Nov 20; 1014(2):125-32.

Thrailkill, K. M.; Quarles, L. D.; Nagase, H.; Suzuki, K.; Serra, D. M., and Fowlkes, J. L. Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5- degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 1995 Aug; 136(8):3527-33.

Titus, L.; Rubin, J. E.; Lorang, M. T., and Catherwood, B. D. Glucocorticoids and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulate parathyroid hormone stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology*. 1988 Sep; 123(3):1526-34.

Todd, R. C.; Freeman, M. A., and Pirie, C. J. Isolated trabecular fatigue fractures in the femoral head. *J Bone Joint Surg [Br]*. 1972 Nov; 54(4):723-8.

Tortorella, M. D.; Burn, T. C.; Pratta, M. A.; Abbaszade, I.; Hollis, J. M.; Liu, R.; Rosenfeld, S. A.; Copeland, R. A.; Decicco, C. P.; Wynn, R.; Rockwell, A.; Yang, F.; Duke, J. L.; Solomon, K.; George, H.; Bruckner, R.; Nagase, H.; Itoh, Y.; Ellis, D. M.; Ross, H.; Wiswall, B. H.; Murphy, K.; Hillman, M. C. Jr; Hollis, G. F.; Newton, R. C. and others. Purification and cloning of aggrecanase-1: A member of the ADAMTS family of proteins [In Process Citation]. *Science*. 1999 Jun 4; 284(5420):1664-6.

Urist, M. R. Observations bearing on the problem of osteoporosis . In: bone as a Tissue. Bodahl K. (ed). McGraw-Hill, New York, 1960: 18-23.

Utsinger, P. D.; Zvaifler, G. E, and Ehrlich, G. E. Rheumatoid Arthritis, etiology, diagnosis and treatment. Philadelphia, JB Lippincott Co; 1985; pp. 1-934.

Van der Mark, K.; Kirsh, T., and Aigner, T. The fate of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York, Raven press; 1992; pp. 221-234.

Vandermeersh, S.; Geusens, P.; Nijs, J., and Dequeker, J. Total body mineral measurement in osteoarthritis, osteoporosis and normal controls. In: Current research in osteoporosis and bone mineral measurement. Ring E.F. (ed). British institute of radiology; London, 1990; p. 49.

Vankemmelbeke, M. N.; Ilic, M. Z.; Handley, C. J.; Knight, C. G., and Buttle, D. J. Coincubation of bovine synovial or capsular tissue with cartilage generates a soluble "Aggrecanase" activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Feb 24; 255(3):686-91.

Vassalli, J. D.; Huarte, J.; Bosco, D.; Sappino, A. P.; Sappino, N.; Velardi, A.; Wohlwend, A.; Erno, H.; Monard, D., and Belin, D. Protease-nexin I as an androgen-dependent secretory product of the murine seminal vesicle. *EMBO J*. 1993 May; 12(5):1871-8.

Vassalli, J. D.; Sappino, A. P., and Belin, D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*. 1991 Oct; 88(4):1067-72.

Verstraeten, A.; Van Ermen, H.; Haghebaert, G.; Nijs, J.; Geusens, P., and Dequeker, J. Osteoarthrosis retards the development of osteoporosis. Observation of the coexistence of osteoarthrosis and osteoporosis. *Clin Orthop*. 1991 Mar; (264):169-77.

Videman, T.; Michelsson, J. E.; Rauhamaki, R., and Langenskiold, A. Changes in 35S-sulphate uptake in different tissues in the knee and hip regions of rabbits during immobilization, remobilization the development of osteoarthritis. *Acta Orthop Scand*. 1976 Jun; 47(3):290-8.

Vikkula, M.; Mariman, E. C.; Lui, V. C.; Zhidkova, N. I.; Tiller, G. E.; Goldring, M. B.; van Beersum, S. E.; de Waal Malefijt, M. C.; van den Hoogen, F. H.; Ropers, H. H. and others. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the COL11A2 locus. *Cell*. 1995 Feb 10; 80(3):431-7.

Vikkula, M.; Nissila, M.; Hirvensalo, E.; Nuotio, P.; Palotie, A.; Aho, K., and Peltonen, L. Multiallelic polymorphism of the cartilage collagen gene: no association with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1993 Oct; 52(10):762-4.

Vikkula, M.; Palotie, A.; Ritvaniemi, P.; Ott, J.; Ala-Kokko, L.; Sievers, U.; Aho, K., and Peltonen, L. Early-onset osteoarthritis linked to the type II procollagen gene. Detailed clinical phenotype and further analyses of the gene. *Arthritis Rheum*. 1993 Mar; 36(3):401-9.

Vikkula, M.; Ritvaniemi, P.; Vuorio, A. F.; Kaitila, I.; Ala-Kokko, L., and Peltonen, L. A mutation in the amino-terminal end of the triple helix of type II collagen causing severe osteochondrodysplasia. *Genomics*. 1993 Apr; 16(1):282-5.

Vilim, V. and Fosang, A. J. Characterization of proteoglycans isolated from associative extracts of human articular cartilage. *Biochem J*. 1993 Jul 1; 293 (Pt 1):165-72.

Vissing, H.; D'Alessio, M.; Lee, B.; Ramirez, F.; Godfrey, M., and Hollister, D. W. Glycine to serine substitution in the triple helical domain of pro- alpha 1 (II) collagen results in a lethal perinatal form of short- limbed dwarfism. *J Biol Chem*. 1989 Nov 5; 264(31):18265-7.

Wallen, P.; Pohl, G.; Bergsdorf, N.; Ranby, M.; Ny, T., and Jornvall, H. Purification and characterization of a melanoma cell plasminogen activator. *Eur J Biochem*. 1983 May 16; 132(3):681-6.

Wei, L.; de Bri, E.; Lundberg, A., and Svensson, O. Mechanical load and primary guinea pig osteoarthritis. *Acta Orthop Scand*. 1998 Aug; 69(4):351-7.

Weintroub, S.; Papo, J.; Ashkenazi, M.; Tardiman, R.; Weissman, S. L., and Salama, R. Osteoarthritis of the hip and fracture of the proximal end of the femur. *Acta Orthop Scand*. 1982 Apr; 53(2):261-4.

Westacott, C. I.; Webb, G. R.; Warnock, M. G.; Sims, J. V., and Elson, C. J. Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum*. 1997 Jul; 40(7):1282-91.

Williams, C. J. and Jimenez, S. A. Heredity, genes and osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1993 Aug; 19(3):523-43.

Wu, J; Murray, J, and Eyre, D. Evidence for copolymeric cross-linking between types II and III collagens in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 1996; 21, 42.

Yamamoto, I.; Shigeno, C.; Potts, J. T. Jr, and Segre, G. V. Characterization and agonist-induced down-regulation of parathyroid hormone receptors in clonal rat osteosarcoma cells. *Endocrinology*. 1988 Apr; 122(4):1208-17.

Yang, C.; Wolf, E.; Roser, K.; Delling, G., and Muller, P. K. Selenium deficiency and fulvic acid supplementation induces fibrosis of cartilage and disturbs subchondral ossification in knee joints of mice: an animal model study of Kashin-Beck disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993; 423(6):483-91.

Yee, J. A.; Yan, L.; Dominguez, J. C.; Allan, E. H., and Martin, T. J. Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J Cell Physiol.* 1993 Dec; 157(3):528-34.

Ziff, M. Rheumatoid arthritis--its present and future. *J Rheumatol.* 1990 Feb; 17(2):127-33.