

Université de Montréal

**L'étude de l'interaction entre les chondrocytes et le
collagène modifié par le 4-Hydroxynonéal :
Implication dans le développement de l'arthrose**

par

Rana El Bikai

Département de Pharmacologie, Université de Montréal
Faculté de médecine.

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)
en Pharmacologie

Janvier, 2010

© Rana El Bikai, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

L'étude de l'interaction entre les chondrocytes et le collagène modifié par le 4-
Hydroxynonéanal :
Implication dans le développement de l'arthrose

Présenté par :

Rana El Bikai

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

- Ghayath Baroudi, président-rapporteur
- Mohamed Benderdour, directeur de recherche
- Hassan Fahmi, co-directeur
- Muhammad Zafarullah, membre du jury

Résumé

OBJECTIF: Récemment, nous avons démontré que la modification du collagène type II (Col II) par le 4-hydroxynonéal (HNE), un produit de la peroxydation lipidique, est augmentée dans le cartilage arthrosique sans qu'on sache la signification de cette augmentation dans la pathogenèse de l'arthrose. L'objectif de cette étude vise à démontrer que cette modification affecte l'interaction chondrocytes/matrice extracellulaire (MEC) et en conséquence induit des changements phénotypiques et fonctionnels de ces cellules.

METHODES: Des plaques de culture ont été préalablement cotées avec du Col II puis traitées avec du HNE (0.1-2 mM) excepté le puits contrôle. Les chondrocytes ont été ensuiteensemencés puis incubés pendant 48 heures. La viabilité des cellules est évaluée par le test MTT. Le Western blot est utilisé pour mesurer l'expression des molécules d'adhésion (l'ICAM-1 et l'intégrine $\alpha 1\beta 1$), de la cyclooxygenase-2 (COX-2), du Col II ainsi que la phosphorylation de la p38 MAPK, ERK1/2 et NF- κ B-p65. La RT-PCR en temps réel est utilisée pour mesurer l'expression de l'ARNm de l'ICAM-1, des intégrines $\alpha 1\beta 1$, de la COX-2 et de la métalloprotéinases-13 (MMP-13). La détermination de l'expression de l'ICAM-1 à la surface des cellules est réalisée par cytométrie de flux. Des kits commerciaux ont servi pour mesurer le niveau de la MMP-13, de la prostaglandine E2 (PGE₂), de l'activité de la caspase-8 et de la phosphorylation de la p38 MAPK, ERK1/2 et NF- κ B-p65. **RESULTATS:** La modification du Col II par 0.2 mM HNE induit significativement l'expression des molécules d'adhésion telles que l'ICAM-1 et l'intégrine $\alpha 1\beta 1$, de la MMP-13 sans avoir un effet sur la morphologie, la survie et le phénotype

cellulaires. Nos résultats montrent aussi une forte augmentation de la phosphorylation de la p38 MAPK, d'ERK1/2 et de NF- κ B-p65. Cependant, la modification du Col II par 2 mM HNE affecte la morphologie et la viabilité cellulaires et induit l'activité de la caspase-8. Elle inhibe fortement l'expression des intégrines α 1 β 1 et du Col II ainsi que la phosphorylation de l'ERK1/2 et de NF- κ B-p65, mais par contre, induit significativement la production de la COX-2 et son produit la PGE₂ ainsi que la phosphorylation de la p38 MAPK. Fait intéressant, le prétraitement des complexes HNE/Col II par 0.1 mM de carnosine empêche les changements phénotypiques et fonctionnels des chondrocytes.

CONCLUSION : Ces nouveaux résultats suggèrent le rôle important de la modification du Col II par le HNE dans l'arthrose, en affectant le phénotype et le fonctionnement cellulaires des chondrocytes. La carnosine, par sa capacité de neutraliser le HNE, a révélé d'être un agent promoteur dans le traitement de l'arthrose.

Mots clés : Arthrose, chondrocyte, peroxydation lipidique, 4-hydroxynonéal, collagène type II, phénotype, catabolisme, inflammation, carnosine.

Abstract

OBJECTIVE: The regulation of cell phenotype and function by the surrounding environment is deeply altered by the oxidative modifications of extracellular matrix (ECM) components that modify their structural and functional properties. This modification may be one cause involved in cartilage degradation in osteoarthritis (OA). Type II collagen (Col II) was reported to be targeted for 4-hydroxynonenal (HNE) binding, a very reactive product of lipid peroxidation. In the present study, we investigated whether HNE-binding to Col II affects OA chondrocytes phenotype and function and then, we determined the protective role of carnosine treatment in preventing these changes. **METHODS:** Isolated human OA chondrocytes were seeded in control wells and in HNE/Col II adducts-coated plates and incubated afterwards for 48 hours. Adhesion molecules at protein and mRNA levels were determined by Western blotting, flow cytometry and real-time RT-PCR. Commercial kits were used to evaluate cell death, caspase-8 activity and levels of prostaglandin E₂ (PGE₂), matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), MAPK and NF- κ B-p65. Col II, cyclooxygenase-2 (COX-2), MAPK and NF- κ B-p65 levels were assessed by Western blotting. **RESULTS:** After 48 hours of incubation, the modification of Col II by 0.2 mM HNE induced strongly the expression of ICAM-1, integrin α 1 β 1, MMP-13 and slightly COX-2 as well as PGE₂ release without affecting cell morphology and viability as well as Col II expression. However, the modification of Col II with 2 mM HNE induced shape changes of cells from typical chondrocyte-like polygon shape to round semi-detached, affecting cells viability and inducing caspase-8 activity. It inhibited the expression of ICAM-1, integrin α 1 β 1 and Col II, but in contrast, induced strongly PGE₂

release and COX-2 expression. All these effects were prevented by 0.1 mM carnosine treatment, an HNE trapping drug. Carnosine was added to HNE-modified, Col II-coated plates 1h before cell seeding. Upon examination of different signalling pathways involved in these responses, we found that modified Col II with 2 mM HNE inhibited strongly the phosphorylation of ERK1/2 and NF- κ B-p65 but induced strongly p38 MAPK. In contrast, the results indicated that MAPK and NF- κ B-p65 were activated when cells were incubated with modified Col II by 0.2 mM HNE. **CONCLUSION:** The interaction between chondrocytes and collagen-bound HNE modulates different signalling pathways via adhesion molecules regulation and consequently leads to the expression of catabolic and inflammatory factors. Carnosine was shown to be an efficient HNE trapping agent able to counteract these effects.

Keywords: Osteoarthritis, chondrocyte, lipid peroxydation, 4-hydroxynonenal, type II collagen, phenotype, catabolism, inflammation, carnosine.

Table des matières

Résumé Français	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
Dédicace	xi
Remerciements	xii

Chapitre 1 : Introduction	1
1- Introduction sur l'arthrose	2
2- Structure et composition d'une articulation saine	2
2.1- Le cartilage articulaire	4
2.1.1- Le collagène	4
2.1.2- Les protéoglycans	6
2.1.3- Les chondrocytes	6
2.2- L'os sous-chondral	6
3- L'articulation arthrosique	7
3.1- Destruction du cartilage articulaire	7
3.2- Remodelage de l'os sous-chondral	10
3.3- Les ostéophytes	11
4- Le rôle des facteurs inflammatoires et cataboliques dans la pathogenèse de l'arthrose	12
4.1- Les molécules pro-inflammatoires	14
4.1.1- Cyclooxygénases et prostaglandines E2	14
4.1.2- Les cytokines pro-inflammatoires : L'interleukine 1 β (IL-1 β)	15

4.2- Les facteurs cataboliques	16
4.2.1- Les protéinases	16
4.2.2- Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs)	17
5- L'interaction entre la matrice extracellulaire et les chondrocytes	21
5.1- Les intégrines	23
5.2- ICAM-1	25
6- Les stress oxydatif	26
6.1- Les lipides et la cellule	26
6.2- Le stress oxydatif et les molécules antioxydantes	26
6.3- La peroxydation lipidique	27
6.3.1- Le 4- Hydroxynonéal (HNE)	31
7- La formation des complexes HNE/protéines	34
8- La modification de la matrice extracellulaire par les produits oxydatifs	36
9- HNE et voies de signalisations	39
10- Les chélateurs des produits de la peroxydation lipidique	40
11- La carnosine : Un trappeur de HNE	42
12- Objectif	43
13- Hypothèse	44
Chapitre 2 : Article	45
Abstract	47
Introduction	49
Material and Methods	52
Results	59
Discussion	63
Reference list	69

Figure Legends	74
Figures	77
Chapitre 3 : Discussion	83
Chapitre 4 : Conclusion	96
Chapitre 5 : Références	99

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : La différence entre une articulation saine et une articulation arthrosique	3
Figure 2 : Les différentes zones constituant le cartilage articulaire	5
Figure 3 : L'homéostasie du cartilage contrôlée par les cytokines	9
Figure 4 : Le déséquilibre anabolique et catabolique	13
Figure 5 : Les protéinases	18
Figure 6 : Le clivage du collagène	19
Figure 7 : Le stress oxydatif et le 4-Hydroxynonéal (HNE)	28
Figure 8 : La peroxydation lipidique	30
Figure 9 : La structure du 4-Hydroxynonéal (HNE).....	33
Figure 10 : La complexation du 4-Hydroxynonéal (HNE) avec d'autres molécules	37

Chapitre 3 : Discussion

Figure 11 : Altération de l'interaction entre cellule et matrice extracellulaire modifiée par le 4-Hydroxynonéal (HNE)	86
---	----

Liste des abréviations

AGEs: Advanced Glycation End Products.

AP-1: Activator Protein-1.

Arg: Arginine.

Ca²⁺: Calcium.

CAR: Carnosine.

Col II : Collagène type II.

COMPs : Cartilage Oligomeric Protein.

COX : Cyclooxygénase.

COX-1 : Cyclooxygénase-1.

COX-2 : Cyclooxygénase-2.

CYS: Cystéine.

CYS-374: Cystéine 374.

DDR 2: Discoidin domain Receptors 2.

DDR: Discoidin Domain Receptors.

DNPH: 2, 4-Dinitrophenylhydrazine.

ERK: Extracellular Signal Regulated Kinase.

FAK: Focal Adhesion Kinase.

GLY: Glycine.

GPxs: Glutathion Peroxydase.

GrB: Growth factor receptor-Bound protein.

GSH: Glutathione.

GST: Glutathion-S-Transferase.

HHE: 4-Hydroxy-2-Hexenal.

HIS: Histidine.

HNE: 4-Hydroxynonéal.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

ICAM-1: Inter-Cellular Adhesion Molecule 1.
IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1.
IL-1R: Interleukin-1 Receptor.
IL-1 α : Interleukin-1 α .
IL-1 β : Interleukin-1 β .
IL-6 : Interleukin-6
IL-8: Interleukin-8
iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase.
JNK: c-Jun N-Terminal Kinase.
KO: Knock-Out.
LFA-1: Leucocyte Function Associated Antigen-1.
LPO: Peroxidation Lipidique.
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.
MDA: Malondialdehyde.
MEC: Matrice extracellulaire.
MMP-1: Matrix MetalloProteinase-1.
MMP-13: Matrix MetalloProteinase-13.
MMP-8: Matrix MetalloProteinase-8.
MMPs: Matrix MetalloProteinases.
MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole.
NF- κ B p65: Nuclear Factor kappa B.
NK: Natural Killer.
NO: Nitric Oxide.
PBS: Phosphate Buffered Saline.
PGE2: Prostaglandine E2.
PGs : Prostaglandines.
PKC: Protein Kinase C.
RAGE : Receptor for the Advanced Glycation End Product.
ROS: Reactive Oxygen Species.

SOD: Superoxide Dismutase.

TGF β : Transforming Growth Factor β .

TGF β 1: Transforming Growth Factor β 1.

TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1.

*À mes parents qui m'ont encouragé tout au
long de mon parcours,*

*À mes amis qui étaient présents en tout temps
et m'ont aidé à surmonter les moments
difficiles,*

*Et surtout à mon frère et ma cousine qui
représentent ma famille au Canada,*

Remerciements

Un spécial remerciement à mon directeur de Recherche Dr. Mohamed Benderdour, pour sa patience et son encouragement continu au cours de ma maîtrise et qui est pour moi un exemple de gentillesse, d'intelligence et de clairvoyance. Je le remercie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir donné le goût de la recherche.

Je lui souhaite le meilleur dans sa carrière et dans la vie.

Un Grand Merci.

Je remercie Dr. Shi Qin pour ses conseils et sa patience. Je tiens également à remercier Dr. Julio Fernandes pour nous avoir permis l'accès à son laboratoire et surtout pour son enthousiasme et son encouragement.

Je remercie Dr. Karim Maghni pour sa précieuse collaboration, qui nous a permis d'enrichir mon projet de recherche en utilisant la technique du FACS. Je remercie aussi bien Dr. Mélanie Welman pour sa gentillesse et pour avoir accepté d'entamer cette technique sous sa supervision et surtout pour m'avoir appris cette technique, je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

N'oubliant pas le Centre de Recherche pour son accueil et les IRSC pour le financement de ce projet et pour leur incitation continue pour la recherche.

Finalement, je remercie les membres du jury qui ont consacré leur temps pour l'étude de mon mémoire, j'apprécie leurs efforts et leurs supports.

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1- INTRODUCTION SUR L'ARTHROSE

L'ostéoarthrose, un sous type d'arthrite, est une maladie chronique dont souffre la majorité de la population âgée et ceci cause un problème socio-économique majeur. L'arthrose est caractérisée par une destruction progressive du cartilage au niveau de l'articulation, une fibrose de la capsule articulaire et un remodelage de l'os sous-chondral causant l'apparition d'ostéophytes (Figure 1). Elle atteint le plus souvent les genoux, les hanches et les mains. Le diagnostic de l'arthrose se fait grâce à une radiographie, montrant une déformation articulaire. Les symptômes de la maladie sont des douleurs modérées ou aiguës au niveau de l'articulation, entraînant des limitations de mouvement, et des bruits de craquements, de plus, des inflammations articulaires secondaires peuvent être détectées (Guccione et al., 1994). Les facteurs de risques potentiels menant au développement de l'arthrose sont: l'obésité, les facteurs génétiques, l'âge et les activités physiques forcées (Helmick et al., 1995; Lawrence et al., 1998).

2- STRUCTURE ET COMPOSITION D'UNE ARTICULATION SAINE

Une articulation, par définition est une jonction permettant de relier deux extrémités osseuses leur donnant ainsi une mobilité l'une par rapport à l'autre. Les extrémités osseuses d'une articulation sont enrobées d'un cartilage articulaire, cette mince couche de matériaux minéraux et organiques contribue à l'amortissement des chocs et à la lubrification de l'articulation. Les deux tissus prédominants au niveau articulaire sont le cartilage et l'os sous-chondral.

De l'articulation normale à l'arthrose

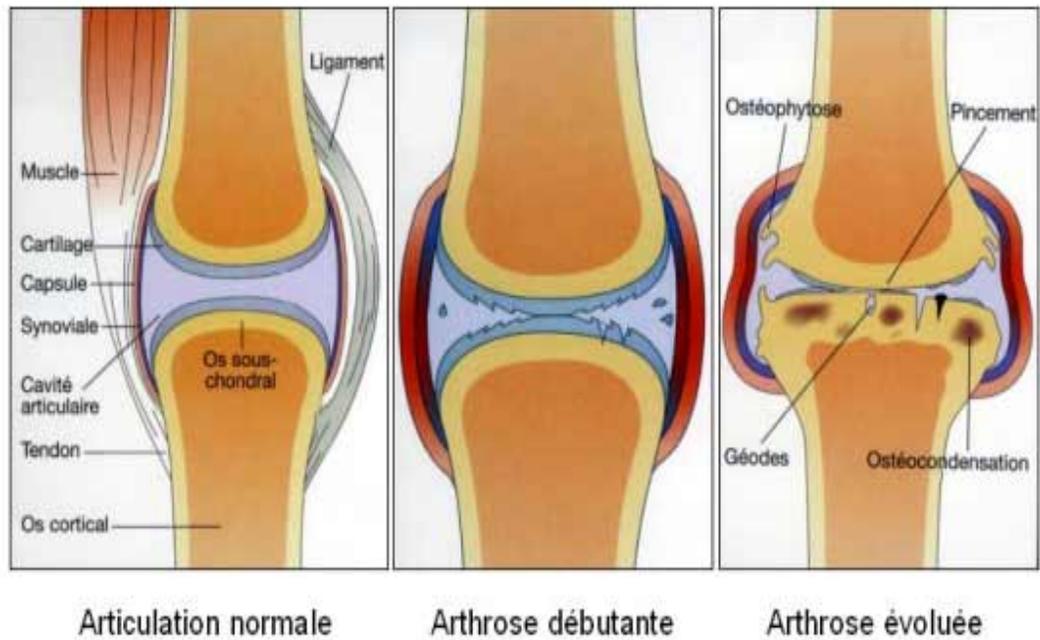


Figure 1 : La différence entre une articulation saine et une articulation arthrosique.

Schéma montrant l'évolution de l'articulation, en passant d'un état normal vers un état arthrosique.

2.1- Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif avasculaire et non innervé, il enrobe les extrémités osseuses et permet d'absorber les chocs mécaniques rendant ainsi l'articulation plus résistante (Mow et al., 1992). Le cartilage est en majorité constitué de collagène, de protéoglycans et d'eau, ce dernier étant le constituant majeur (65-85 %) (Mankin and Thrasher, 1975). D'autres constituants de la matrice existent tels que l'acide Hyaluronique, les COMPs, les agrégans, etc. Dans ce tissu existe un seul type cellulaire : les chondrocytes, qui sont responsables du renouvellement de la MEC au niveau du cartilage (Setton et al., 1999). La répartition et la forme de ces constituants varie selon la profondeur du cartilage. Il en existe quatre zones constituant le cartilage : Une zone superficielle, une zone moyenne ou transitionnelle, une zone profonde et une zone calcifiée (Venn, 1979) (Figure 2).

2.1.1- Le collagène

Le collagène est le constituant majeur du cartilage à part l'eau. Il existe plusieurs types de collagène, mais le plus abondant est le collagène type II (Col II). Les molécules de collagènes s'associent en forme de fibrilles de différentes tailles et épaisseurs. La disposition de ces fibrilles varie en fonction de la profondeur du tissu cartilagineux (Clark, 1991). Le Col II est formé de trois chaînes identiques de polypeptides ((α I)₂, (α II)₁) qui s'enroulent et forment une triple hélice. Ce réseau de collagène articulaire procure une

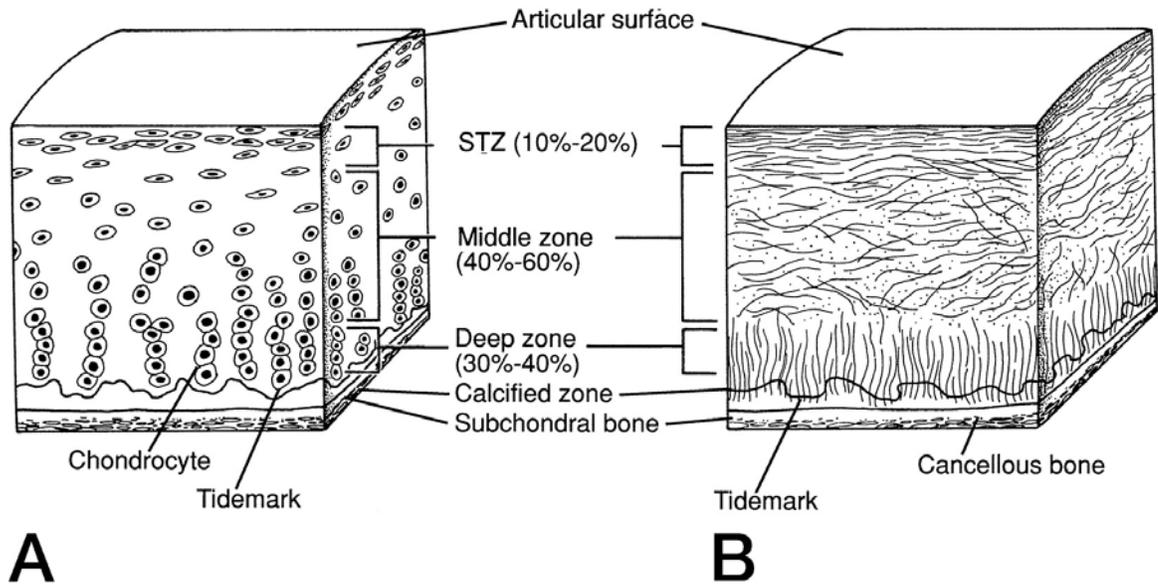


Figure 2 : Les différentes zones constituant le cartilage articulaire. Le schéma A montre la répartition des chondrocytes en fonction des différentes zones du cartilage. Et le schéma B indique la disposition des fibres de collagène et des protéoglycans dans ces zones. Dans la zone superficielle, on observe une condensation des fibres de collagène qui sont disposées parallèlement à la surface articulaire, et une faible contenance en protéoglycans. Dans la zone moyenne, les fibres de collagène sont disposées aléatoirement et la contenance en protéoglycans est au maximum. Finalement, dans la zone profonde, les fibres de collagène sont épaisses et perpendiculaires par rapport à l'os sous-chondral. Dans cette zone, la présence de protéoglycans est minime.

résistance contre les chocs subit au niveau de l'articulation, de plus, il aide à maintenir la forme et le volume de ce tissu conjonctif (Martel-Pelletier et al., 2008).

2.1.2- Protéoglycans

Les protéoglycans sont les deuxièmes constituants majeurs du cartilage articulaire après le collagène. Un protéoglycan est formé d'une chaîne primaire de protéines de laquelle irradient de nombreuses chaînes de glycosaminoglycans. La structure macromoléculaire de ces protéines les rend très volumineux. Les protéoglycans sont hydrophiles et sont caractérisés par leur flexibilité et leur capacité à se déformer réversiblement suite à un stress mécanique (Muir, 1983).

2.1.3- Les chondrocytes

Les chondrocytes (2% du volume total du cartilage) (Poole AR, 2001) baignent dans une MEC formée majoritairement par de l'eau, du Col II et de protéoglycans. L'interaction entre les cellules et la MEC est crucial pour la subsistance de ce type cellulaire vue l'inexistante interaction cellule-cellule. Les chondrocytes vivent dans un milieu anaérobique, l'apport en nutriments et l'élimination des déchets se fait par diffusion à travers la MEC. Les chondrocytes sont responsables du renouvellement et de la maintenance de cette matrice (Martel-Pelletier et al., 2008).

2.2- L'os sous-chondral

L'os sous-chondral est protégé par le cartilage articulaire qui l'enrobe. Les constituants de cet os sont : les ostéoblastes qui sont responsables de la formation osseuse, les ostéoclastes qui ont pour rôle de dégrader le tissu osseux, les ostéocytes et la MEC. Cette matrice est formée de molécules minéralisées telles que l'ostéocalcine, de cristaux hydroxyapatites et de molécules non minéralisées telles que le collagène type I. L'équilibre de cette composition osseuse est importante afin de garder l'homéostasie des tissus osseux et cartilagineux (Burr, 2004). L'os peut être séparé anatomiquement en deux entités: Le plateau de l'os sous-chondral et l'os sous-chondral trabéculaire. Le plateau de l'os sous-chondral est un os cortical non poreux et pauvrement vascularisé. Il est séparé du cartilage articulaire par la zone calcifiée qui constitue la limite entre les tissus osseux et cartilagineux (Goldring, 2008).

3- L'ARTICULATION ARTHROSIQUE

L'équilibre et l'homéostasie au niveau des tissus articulaires sont cruciaux pour maintenir une articulation saine. Au moment où cet équilibre est rompu, des changements phénotypiques et morphologiques apparaissent et mènent à une destruction du cartilage articulaire (von der Mark K, 1986; von der Mark et al., 1977), un remodelage osseux et par la suite une perte de la fonction articulaire normale. Les stress mécaniques, le stress oxydatif, l'âge et plein d'autres facteurs conduisent au déséquilibre entre les fonctions anaboliques et cataboliques, conduisant ainsi à la destruction du cartilage articulaire et à l'apparition d'ostéophytes (Martel-Pelletier et al., 2008).

3.1- Destruction du cartilage articulaire

Les chondrocytes étant le seule type cellulaire existant au niveau du cartilage, ils sont alors les seuls à maintenir l'homéostasie de ce tissu. Malgré leur faible présence ils sont capables de maintenir et régénérer la MEC. Les chondrocytes ont une forte activité métabolique, ils maintiennent l'équilibre entre (i) le processus anabolique contrôlé par le facteur de croissance 1 analogue à l'insuline (IGF-1) et le facteur de croissance transformant beta1 (TGF- β 1) qui stimulent la production des macromolécules de collagène et de protéoglycans (Westacott and Sharif, 1996) ; et (ii) le processus catabolique contrôlé par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 beta (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) qui stimulent la synthèse les métalloprotéases (MMPs) responsables de la dégradation de la MEC (Mankin et al., 1971). Lorsque le diagnostic de l'arthrose est déclaré, ceci indique que le déséquilibre de cette homéostasie est établi. Dans le cas d'arthrose précoce, on observe généralement une accumulation d'eau au niveau du cartilage, ce qui mène à l'altération structural du réseau de collagène et ainsi la perte de l'élasticité articulaire. Au cours du développement de la maladie, on a une perte graduelle des protéoglycans et un clivage de la triple hélice de collagène conduisant à la dégradation progressive du cartilage (Mankin et al., 1971). Les chondrocytes tentent de réparer les dommages causés mais l'équilibre entre la synthèse et la dégradation est rompue favorisant le processus catabolique, en augmentant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et des facteurs cataboliques (Mankin et al., 1971) (Figure 3).

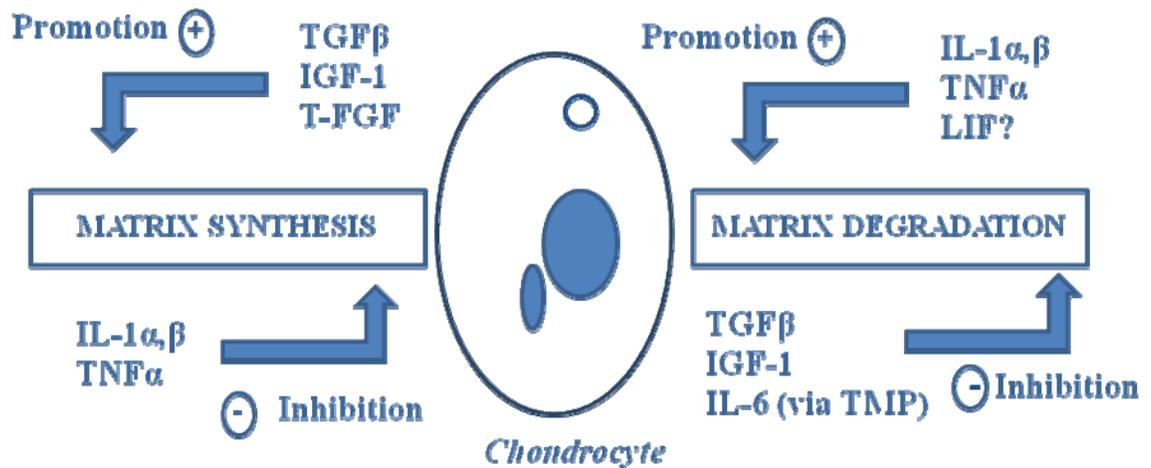


Figure 3 : L'homéostasie du cartilage contrôlée par les cytokines. Le schéma ci-dessus montre l'effet de différentes cytokines pro-inflammatoires sur la MEC. Les cytokines « dites cataboliques » telles que l'IL-1 α , β et le TNF α induisent la synthèse des métalloprotéases (MMPs) responsables de la dégradation de la MEC. Les cytokines « dites anaboliques » telles que le TGF β et IGF-1 stimulent la production des constituants majeurs de la MEC tels que le collagène et des protéoglycans (Westacott and Sharif, 1996).

3.2- Remodelage de l'os sous-chondral

L'arthrose atteint autant les os que le cartilage articulaire. Des changements structuraux au niveau de l'os sous-chondral apparaissent et un remodelage de ce tissu mène à son épaissement, à la formation d'ostéophytes, à la libération de minéraux de la MEC et à la perte de l'élasticité articulaire (Boyd et al., 2002; Mansell et al., 1997; Neilson et al., 2004). L'os devient survascularisé et le développement de microfissures au niveau de la MEC contribue à ce remodelage. Des altérations au niveau de cette matrice ont lieu telle que la modification de la production des cytokines pro-inflammatoires, un changement structural du collagène et un changement au niveau de la minéralisation (Bailey et al., 2002). Le processus de remodelage est initié par une phase de résorption, qui implique l'activation des ostéoclastes. Ces derniers ont pour rôle de dégrader la matrice osseuse minéralisée (Teitelbaum, 2007; Teitelbaum and Ross, 2003). Suite à cela, la phase de formation commence et ceci indique une nouvelle formation osseuse par les ostéoblastes. Durant cette étape, on observe soit une minéralisation rapide caractérisée par un délai où le dépôt de matières minérales est rapide et suivie par une très faible minéralisation menant à la formation d'un os hypo-minéralisé facile à se déformer sous-pression (Burr, 2004; Day et al., 2001; Li and Aspden, 1997). Soit que cette étape peut être caractérisée par une minéralisation lente avec un dépôt minérale continue tout au long de la phase de formation. Ainsi, on aura un os hyper-minéralisé résistant aux agressivités subit au niveau de l'articulation mais plus facile à se casser. Ces deux formes de minéralisations mènent à une malformation osseuse (Day et al., 2001; Day et al., 2004). De plus, une atteinte du

collagène au niveau de la MEC semble jouer un rôle additionnel dans le remodelage osseux. En effet, on observe au niveau de l'os arthrosique une augmentation de l'hydroxylation et une présence anormale de chaînes homotrimérique (αI)₃ au lieu des chaînes hétérotrimériques (αI)₂(αII)₁ de collagène. Ces deux changements, l'hydroxylation et la formation des chaînes homotrimériques de type I sont responsables de la diminution des propriétés mécaniques de l'os (Bailey et al., 2002; Banse et al., 2002; McBride et al., 1998).

3.3- Les ostéophytes

Les ostéophytes sont des excroissances osseuses et fibrocartilagineuses, ils sont localisés aux extrémités de l'os, leur détection par radiographie est une évidence clinique de l'arthrose. Les cellules souches mésenchymateuses et les cellules du périoste présentes à la surface de l'os sont considérés comme la source de formation d'ostéophytes (Ackerman and Ahmad, 2000; Shirasawa et al., 2006). Le processus débute par une différenciation de ces cellules en chondrocytes qui s'hypertrophient par la suite, dû à l'ossification endochondral, conduisant à l'apparition de cette excroissance osseuse nommée ostéophyte. De plus, la production locale des facteurs de croissance telle que le TGF β et l'IGF-1 promouvoit le développement de ces ostéophytes (Blaney Davidson et al., 2007; van der Kraan and van den Berg, 2007). Cependant, d'autres facteurs semblent moduler ce processus, comme le niveau d'oxygène présent au niveau de l'articulation et la pression dynamique des fluides. Par exemple, un pourcentage de 12-15% d'oxygène, qui est considéré comme un faible niveau, initie la chondrogenèse. De plus une faible pression

dynamique exercée par les fluides promouvoit cette différenciation favorisant ainsi la formation d'ostéophytes (Mukherjee et al., 2001; O'Driscoll et al., 1997).

4- LE RÔLE DES FACTEURS INFLAMMATOIRES ET CATABOLIQUES DANS LA PATHOGENÈSE DE L'ARTHROSE

Au contraire de l'arthrite rhumatoïde, l'arthrose n'est pas considérée comme une maladie inflammatoire primaire, malgré qu'on retrouve au niveau de l'articulation arthrosique des molécules pro-inflammatoires, des cytokines et des facteurs de croissances. Dans le cartilage articulaire et même dans l'os sous-chondral on observe un déséquilibre entre les fonctions anaboliques (la synthèse) et les fonctions cataboliques (la résorption), ce qui mène à une destruction précoce du cartilage, un remodelage osseux et à une perte permanente de la structure et de la fonction articulaire normale. Les cytokines tel que l'IL-1 β et la TNF α sont produites par les synoviocytes, les cellules mononuclées ou par le cartilage articulaire lui-même. Ces molécules stimulent l'expression géniques des MMPs tel que la MMP-13 et empêchent les chondrocytes de réparer la MEC dégradée. De plus, ces cytokines sont capables de stimuler la production de la prostaglandine E2 (PGE₂) et la libération de l'oxyde nitrique (NO) via l'induction de la cyclooxygenase-2 (COX-2) et la forme inductible de NO synthase (iNOS) respectivement (Farahat et al., 1993; Fernandes et al., 2002; Haraoui et al., 1991; Sofat, 2009) (Figures 4).

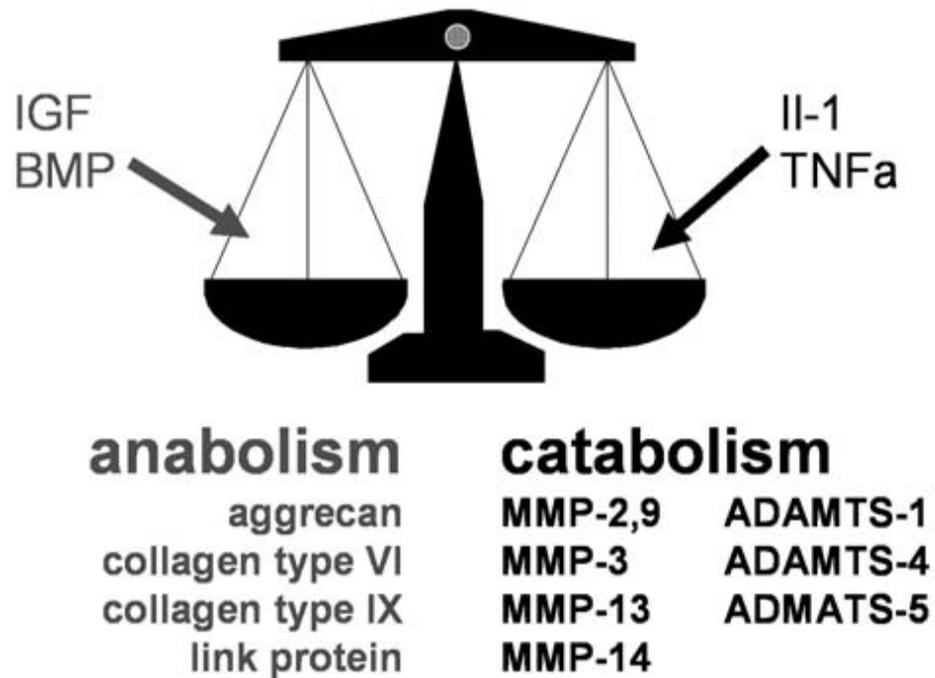


Figure 4: Le déséquilibre anabolique et catabolique. Dans l'arthrose, la production des facteurs cataboliques sont plus favorisés que celle des facteurs anaboliques, ce qui mène à la destruction éventuelle du cartilage au niveau de l'articulation (Aigner et al., 2006).

4.1- Les facteurs pro-inflammatoires

4.1.1- Cyclooxygénases (COXs) et prostaglandines E2 (PGE₂)

Les prostaglandines (PGs) appartiennent à la famille des eicosanoïdes, elles peuvent être sécrétées par presque tous types cellulaires. L'acide arachidonique qui est un acide gras polyinsaturé et provenant de notre apport alimentaire, est la source de la production des PGs (Funk, 2001; Smith, 1989). *In vivo*, la cyclooxygénase (COX) est une enzyme qui est capable de le transformer en PGs. Brièvement, l'acide arachidonique réside au niveau de la membrane phospholipidique des cellules, sa libération se fait grâce à une enzyme la phospholipase A₂. Une fois libéré, il sera oxygéné par une deuxième enzyme la COX donnant des produits intermédiaires tel que la prostaglandine H₂, qui seront à leurs tours transformés en produits finaux dans une chaîne de réaction aboutissant à la production de la PGE₂ (Bingham and Austen, 1999; Smith et al., 2000; Vane et al., 1998). Plusieurs isoformes de cette enzyme existent, la forme COX-1 est constitutivement exprimée dans les tissus et contribue à leur homéostasie. Cependant, la COX-2, qui représente la forme induite de la COX, est régulée par les cytokines pro-inflammatoires, par les oncogènes et par les facteurs de croissance. Les PGs sont des marqueurs d'inflammation, dont leur production dépend largement de l'expression de la COX-2 (Dubois et al., 1998; Vane et al., 1998). Dans les tissus articulaires arthrosiques, on rapporte un niveau très élevé de la PGE₂. La production de cette molécule par les chondrocytes inhibe la synthèse du collagène, et induit la production des MMPs (Bunning and Russell, 1989). D'autre part, la PGE₂ stimule l'expression de l'IL-1 β et amplifie ainsi l'inflammation locale. Plusieurs études ont

montrées que la PGE₂ est capable de moduler la résorption osseuse en stimulant la différenciation des cellules souches en ostéoclastes. Enfin la PGE₂ est considérée comme une molécule pro-inflammatoire vu sa capacité d'induire différents facteurs cataboliques et inflammatoires (Robinson et al., 1975).

4.1.2- Les cytokines pro-inflammatoires : Interleukine 1beta (IL-1 β)

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle très important dans l'initiation et la progression de l'arthrose. L'IL-1 β comme le TNF α induisent la production d'autres cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 par les chondrocytes et les cellules synoviales. En plus, ils stimulent la synthèse de PGE₂ et des protéinases (Bertolini et al., 1986). Il a été rapporté que l'IL-1 β est sécrétée dans son état actif dans le liquide synovial, la membrane synoviale et le cartilage provenant des patients atteints d'arthrose. Afin d'exercer son effet biologique, l'IL-1 β se fixe à son récepteur à la surface des chondrocytes. Cette cytokine possède deux récepteurs l'IL-1R type I et type II ; le type I possède une plus grande affinité à l'IL-1 β et c'est grâce à ce récepteur que les signaux de transduction sont transmis à la cellule. Plusieurs études démontrent que l'expression de l'IL-1R type 1 et l'IL-1 β sont augmentées au niveau des chondrocytes et des synoviocytes arthrosiques, respectivement. Ceci rend les chondrocytes plus sensible aux stimulations par les IL-1 β grâce à l'expression accrue de son récepteur, l'IL-1R type 1 (Martel-Pelletier et al., 1992; Sadouk et al., 1995). Cette cytokine exerce plusieurs effets sur les chondrocytes, elle atténue l'expression des constituants majeurs du cartilage tel que le Col II et les protéoglycans, tout en défavorisant les activités anaboliques (Goldring et al., 1988; Lefebvre et al., 1990). De plus, l'IL-1 β est

impliquée dans la régulation de l'expression de certaines voies de signalisations, comme la voie des MAPK (Mitogen Activated protein Kinase), plus particulièrement les ERK (extracellular signal regulated kinase), la p38 MAPK, la JNK (c-Jun N-Terminal kinase) et le NF- κ B (nuclear factor-kappa B) (Aigner et al., 2006; Mengshol et al., 2000). Lorsque l'IL-1 β active la voie des MAPK, elle induit indirectement l'expression de la COX-2 et alors la production de la PGE₂, ce qui amplifie l'inflammation au niveau articulaire.

4.2- Les facteurs cataboliques

4.2.1- Les protéinases

Comme déjà décrit plus haut, l'arthrose est caractérisée par une destruction du cartilage articulaire et par un remodelage osseux. La principale cause de ce dommage est la présence des protéinases au niveau de l'articulation. Dans les conditions normales, l'activité protéolytique de ces enzymes est contrôlée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (Murphy and Willenbrock, 1995). Normalement, ces enzymes contribuent à l'homéostasie de certains tissu, elles sont essentielles dans le développement embryonnaire, dans la croissance et dans le remodelage de certains tissu où la MEC doit se dégrader et se renouveler. Par exemple, lors de la croissance des os long, l'ossification endochondral est suivie par un remplacement du cartilage avasculaire par une matrice osseuse minéralisée et richement vascularisée (Ballock and O'Keefe, 2003; Ornitz and Marie, 2002; Provot and Schipani, 2005). Dans le cas de l'arthrose, les protéinases sont synthétisées par les chondrocytes d'une façon incontrôlable. Il existe cinq classes de protéinases, et elles sont classifiées selon le groupement chimique qui participe à l'hydrolyse des pongs peptidiques.

En premier lieu, on trouve des protéases à cystéine, à aspartate et à thréonine qui sont activés à pH acide dans le milieu intracellulaire. Ensuite, on trouve les protéases à sérine et les MMPs qui sont activés à pH neutre et agissent au niveau extracellulaire (Barrett, 1994). On s'intéresse dans cette étude surtout aux MMPs et plus spécifiquement à la MMP-13 qui est active dans le milieu extracellulaire et en particulier dans la matrice cartilagineuse (Figure 5). Les MMPs appartiennent à la famille des protéinases Zinc-dépendant, elles sont distinguées par leurs motifs de zinc qui sont hautement conservés et qui contiennent trois résidus d'histidines liés au zinc qui constituent le site catalytique (Stocker et al., 1995).

4.2.2- Les Métalloprotéinases de la matrice (MMPs)

Le réseau de collagène a une structure assez rigide et solide menant ainsi à la formation d'un cartilage résistant. Dans l'arthrose, la destruction des fibres de collagène est irréversible. Ces fibres sont formées par trois chaînes de polypeptides qui s'enroulent pour former une triple hélice de droite, cette structure est assez résistante aux attaques protéolytiques. La collagénase, qui fait partie de la famille MMP, est la seule enzyme capable de cliver les trois chaînes de la triple hélice produisant ainsi deux fragments de longueur différentes. Le premier fragment aura une dimension égale au trois quart de la longueur initial de la fibre de collagène et le quart restant constituera le deuxième fragment (Netzel-Arnett et al., 1991) (Figure 6).

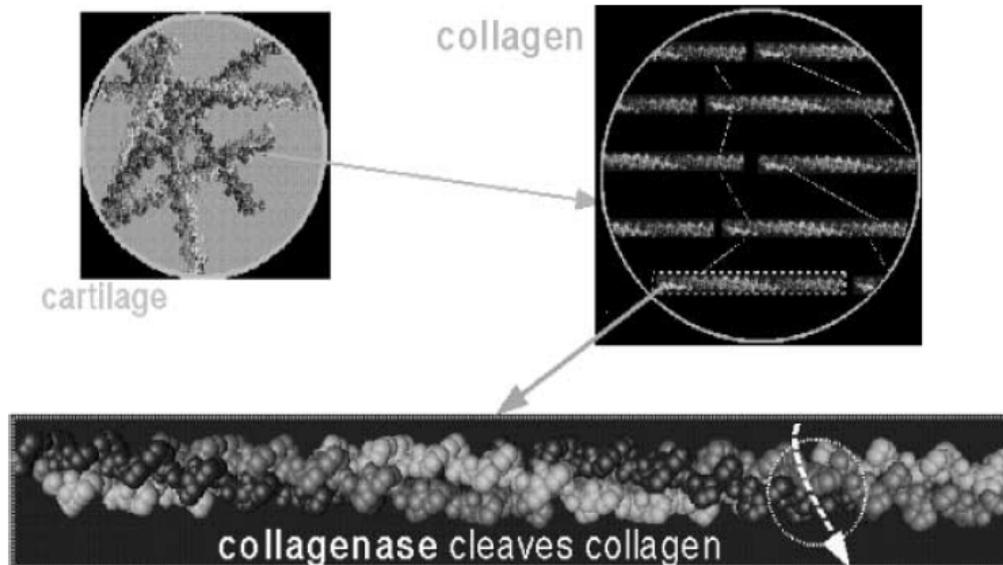


Figure 6: Le clivage du collagène. La collagénase coupe les fibres de collagène en deux fragments de différentes tailles, conduisant à la destruction du cartilage (Borkakoti, 2000).

En se basant sur la spécificité du substrat on peut distinguer différents types de MMPs, les collagénases, les stromelysines et les gélatinases. La famille des collagénases regroupe trois types de MMPs, la MMP-1 (fibroblaste collagénase 1), la MMP-8 (neutrophile collagénase 2) et la MMP-13 (collagénase 3). Malgré que toutes ces MMPs clivent les fibres de collagène, mais chacune a une affinité différentes envers un type de collagène (Netzel-Arnett et al., 1991). Par exemple, la MMP-8 a une préférence pour le collagène type I, alors que la MMP-13 en a une préférence envers le Col II. Concernant la destruction du cartilage, la MMP-13 est considéré l'enzyme principale contribuant à ce dommage vu sa grande affinité envers le Col II qui est le constituant majeur du cartilage articulaire. La synthèse de la MMP-13 est régulée par les cytokines et les molécules pro-inflammatoires qui se fixent sur leur récepteur au niveau des chondrocytes et médient leur signal intracellulaire (Birkedal-Hansen et al., 1993). De même que le cartilage, l'os subit un remodelage et une dégradation de la matrice. Les ostéoclastes sont les principaux acteurs du remodelage osseux, ils sécrètent des ions H^+ afin de décalcifier les matériaux minéraux de la matrice. Suite à cela, commence la dégradation de la matrice dans un environnement acide (pH entre 4 et 5) et hypercalcifié (entre 40 et 50 mM de Ca^{2+}) (Delaisse, 1992). Les MMPs sont essentiels pour l'initiation du processus de résorption ostéoclastique, puisque les MMPs et surtout la MMP-13 sécrété par les ostéoblastes, sont responsables de la dégradation du collagène au niveau de la surface osseuse. La destruction du réseau de collagène est essentielle afin de libérer la matrice des molécules non-minéralisé, permettant aux ostéoclastes de se fixer sur la matrice osseuse minéralisée et procéder avec la résorption (Takaishi et al., 2008). Pour conclure, dans l'arthrose on a une inflammation secondaire au

niveau des tissus articulaires (cartilagineux et osseux), ceci est mis en évidence par la production des cytokines et des molécules inflammatoires. Ces molécules stimulent les chondrocytes et les ostéoblastes à sécréter des médiateurs cataboliques tels que la MMP-13 qui sera responsable de la dégradation du réseau de collagène. Cette destruction est à l'origine de la disparition du cartilage articulaire et à l'initiation du processus de résorption osseuse et par la suite son remodelage. Donc les MMPs jouent un rôle très essentiel dans la progression de l'arthrose.

5- L'INTERACTION ENTRE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE ET LES CHONDROCYTES

Dans le cartilage articulaire, on retrouve une faible proportion de chondrocytes. Étant donné qu'ils sont le seul type cellulaire existant, les chondrocytes jouent un rôle crucial dans le maintien de la stabilité et de l'homéostasie de ce tissu. Au niveau du cartilage, les chondrocytes ne communiquent pas entre elles mais par contre elles sont dépendantes de leur interaction avec la MEC. Les signaux sont transmis via des ligands solubles qui diffusent à travers la membrane et agissent au niveau des chondrocytes, ou par contact direct entre des molécules de la matrice et leurs récepteurs correspondant au niveau des cellules (van der Kraan et al., 2002). La MEC est un élément important dans la régulation de différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation et l'expression du phénotype. Cette régulation se fait grâce à des « récepteurs d'adhésion » qui attachent les cellules aux molécules de la matrice et ceci dans les deux modèles *in vivo* et *in vitro* (Hynes, 1992). À la surface des chondrocytes on retrouve des récepteurs de la

matrice qui lie la MEC vers les constituants internes de la cellule tels que les éléments du cytosquelette et les composantes protéiques impliquées dans la transduction du signal. L'attachement des cellules aux molécules de la MEC via les récepteurs de surface stabilise le phénotype cellulaire. Une des familles les plus décrites des récepteurs de surface est l'intégrine, qui est une superfamille de glycoprotéines constituées de deux sous-unités distincts α et β (Hynes, 2002). Les chondrocytes expriment les deux sous-unités de l'intégrine à leur surface aussi bien que d'autres types de « récepteurs d'adhésion » tels que les CD44, l'annexine V (ou anchorine CII) et l'ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) (Knudson et al., 1996; Loeser et al., 1995; Woods et al., 1994). Une autre famille de récepteur aussi importante que l'intégrine est exprimée par les chondrocytes, la famille des DDR (Discoidin domain receptors). Les DDR appartiennent à la superfamille des récepteurs Tyrosine Kinase qui ont comme ligand le collagène. Le nanisme est une caractéristique des souris n'exprimant pas le récepteur DDR2 et ceci est dû à la diminution de la prolifération des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance (Leitinger and Kwan, 2006; Shrivastava et al., 1997). Par contre, des études ont démontré une surexpression de ce récepteur au niveau des chondrocytes articulaires chez les souris arthrosique, ce qui met en évidence l'implication du DDR2 dans le développement de l'arthrose (Labrador et al., 2001; Xu et al., 2005). Les annexines V (anchorines II) exprimés à la surface des chondrocytes s'adhèrent spécifiquement au Col II. Lorsque l'anticorps anti-anchorine II masque le site de fixation de cette molécule, les chondrocytes se détachent du Col II indiquant l'importance de ces molécules dans l'adhésion cellulaire. (Reid et al., 2000). Les CD44 sont des récepteurs membranaires qui se fixent au Hyaluronane. Cette

liaison affecte le fonctionnement des chondrocytes et l'homéostasie du cartilage (Ishida et al., 1997). Le blocage de ce récepteur par son anticorps induit la dégradation du cartilage. En conclusion, la MEC est importante pour la régulation de certaines fonctions des chondrocytes, donc une simple perturbation au niveau de cette interaction pourrait modifier l'activité des cellules en modulant la voie de signalisation, le phénotype et leur morphologie (Knudson et al., 2000).

5.1- Les intégrines

L'intégrine est une glycoprotéine transmembranaire hétérodimérique constituée d'une sous-unité α et d'une autre sous-unité β . Cette protéine a un domaine extracellulaire lié à des protéines spécifiques de la matrice et un autre domaine cytoplasmique qui interagit avec le cytosquelette et les protéines de signalisation à l'intérieur de la cellule (Gumbiner, 1996). Les chondrocytes expriment à leur surface des sous-ensembles de la famille des intégrines, certains sont des récepteurs de la fibronectine ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$), d'autres sont des récepteurs de la laminine ($\alpha 6\beta 1$) et d'autres sont les récepteurs du collagène ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$) (Egerbacher and Haeusler, 2003; Loeser, 2000; Loeser, 2002). L'intégrine se lie généralement aux composants de la MEC au niveau d'une séquence arginine-glycine-aspartate (RGD) (Ruoslahti, 1991). Une fois que les molécules de la matrice reconnaissent les intégrines un signal de transduction est généré et parvient du milieu externe vers l'intérieur de la cellule, ce qui s'appelle un signal « outside-in » (Loeser et al., 2000). Une panoplie de complexes protéiques se forment lorsque les cellules s'attachent à la matrice via les intégrines et c'est grâce à ces complexes que le signal est conduit vers l'unité

effectrice (le cytosquelette) à l'intérieur de la cellule (Clancy et al., 1997; Damsky and Werb, 1992; Parsons et al., 1994; Ruoslahti, 1991). La signalisation engendrée par les intégrines a fait le sujet de plusieurs études, ce qui a mis en évidence l'implication de ce récepteur dans l'homéostasie du cartilage (Loeser, 2002; Millward-Sadler and Salter, 2004). Les études faites sur la signalisation induite par l'intégrine *in vitro* indiquent que la perte de la sous-unité $\alpha 1$ spécifique pour l'adhésion au collagène mène à l'apoptose et à l'anomalie de la forme des chondrocytes. L'étude menée par Hirsch et al. démontre que l'utilisation d'un anticorps contre l'intégrine induit une répression de la différenciation hypertrophique et réduit la viabilité des chondrocytes (Hirsch et al., 1997). *In vivo*, le knockout (KO) des gènes des intégrines $\alpha 10$ et $\alpha 1$ résulte en une retardation de la croissance et en un dysfonctionnement de la plaque de croissance (Bengtsson et al., 2005; Zemmyo et al., 2003). Au niveau de l'os, les récepteurs exprimés à la surface des cellules osseuses interagissent avec différentes protéines de la matrice telle que le collagène type I, la thrombospondine, la fibronectine, l'ostéopontine et la vitronectine. Certaines études démontrent la capacité de ces protéines à altérer la croissance, la morphologie et l'expression phénotypique des cellules osseuses (Masi et al., 1992; Seyedin and Rosen, 1990). Les ostéoblastes expriment différents sous-type d'intégrines tels que les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αV et les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 3$ qui jouent un rôle très important dans l'attachement des cellules à la matrice et dans la régulation de la formation et la résorption osseuse (Gronowicz and Derome, 1994; Grzesik and Robey, 1994). Ces récepteurs transmettent alors les informations de la matrice vers l'intérieur de la cellule à l'aide de

signaux de transduction mettant en œuvre différentes voies de signalisation comme la voie MAPK et des FAK (focal adhesion kinase) (Clark and Brugge, 1995).

5.2- ICAM-1

Plusieurs études ont démontré la présence de cytokines pro-inflammatoires au niveau de l'articulation arthrosique, ces molécules seront responsables de moduler l'activité des chondrocytes et seront capables de recruter des leucocytes à ce site inflammatoire via le récepteur ICAM-1. Ce dernier est une glycoprotéine exprimée à la surface cellulaire, elle a été définie par un anticorps monoclonal qui inhibe l'agrégation du phorbol ester lors de la stimulation par des leucocytes (Dustin et al., 1986). L'ICAM-1 agit comme un ligand des LFA-1 (Leucocyte function associated antigen-1) présents à la surface des lymphocytes, macrophages/monocytes, granulocytes et les cellules NK (Natural killer) (Marlin and Springer, 1987; Rothlein et al., 1986). Au cours de l'inflammation, les leucocytes et les lymphocytes stimulent et régulent l'expression de l'ICAM-1 au niveau de certaines cellules, telles que les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Horner et al., 1995; Yong and Khwaja, 1990). D'où l'importance de l'expression de l'ICAM-1 à la surface des chondrocytes à des fins d'adhésion et d'interaction leucocytaires au niveau du cartilage endommagé. Pitzke et al. ont démontré que l'expression de l'ICAM-1 est constante et très élevée au niveau des chondrocytes isolés de leur MEC. Cette perte de matrice semble induire l'expression de cette molécule d'adhésion à la surface cellulaire (Pitzke et al., 1994). En général, les études faites sur l'expression de l'ICAM-1 à la surface des chondrocytes montrent que ces cellules n'expriment pas cette molécule

constitutivement, mais par contre elle est induite par le traitement à l'IL-1 α (Davies et al., 1991; Davies et al., 1992).

6- LE STRESS OXYDATIF

6.1- Les lipides et la cellule

Dans la nature, les acides gras polyinsaturés jouent un rôle physiologique très important, ils procurent de l'énergie aux cellules et ils sont à la base de la structure membranaire. De plus, ils jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire et la régulation de certains gènes. Les molécules lipidiques constituent à peu près 30 à 80% de la masse cellulaire et le restant sont des protéines. L'insaturation existante dans les chaînes d'acides gras détermine la température de fusion des triglycérides et la fluidité des membranes biologiques. La membrane cellulaire est formée d'une bicouche phospholipidique ce qui donne la fluidité et la flexibilité à cette structure et procure une perméabilité à certaines molécules telles que l'eau (Catala, 2009; Poulos, 1995).

6.2- Les stress oxydatif et les systèmes antioxydants

Dans les cellules aérobiques, environ 2% de la quantité d'oxygène consommé lors de la respiration cellulaire seront utilisés dans la génération des radicaux libres d'oxygène (ROS). Dans les cellules humaines, le niveau des ROS est contrôlé par l'existence de deux systèmes antioxydants qui maintiennent leur niveau physiologique. Le premier système est constitué de composés de faibles poids moléculaires qui limitent la propagation des radicaux libres dérivant du stress oxydatif. Une molécule très importante jouant ce rôle est

le Glutathion (GSH) qui est le substrat de deux enzymes la Glutathion peroxydase (GPxs) et la Glutathion-S-transférase (GST). Ce système est considéré comme la première ligne de défense contre les radicaux libres (Acworth IN, 1997). La deuxième ligne de défense sera attribuée aux constituants du deuxième système qui sont les enzymes antioxydantes. Le rôle de ces enzymes est plutôt préventif, parmi ces protéines on a la superoxyde dismutase (SOD) qui est une enzyme capable de décomposer l'anion superoxyde prévenant ainsi l'initiation de la peroxydation lipidique et le dommage cellulaire (Awasthi et al., 1975; Takahashi et al., 1987) (Figure 7).

6.3- La peroxydation lipidique

Le stress oxydatif est considéré comme un modulateur majeur de la cascade de signalisation modulant les différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, les réponses inflammatoires, la stimulation des molécules d'adhésion et la production de chimokines. Il est dû à un déséquilibre entre le système pro-oxydant et le système antioxydant (Sies and Cadenas, 1985). La peroxydation lipidique est un mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras membranaires conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables de la diminution de la fluidité membranaire, qui intervient dans certaines pathologies dans lesquelles le stress oxydant est impliqué. La membrane cellulaire est formée d'une bicouche phospholipidique contenant des chaînes d'acide gras polyinsaturées.

Stress oxydatif et le HNE

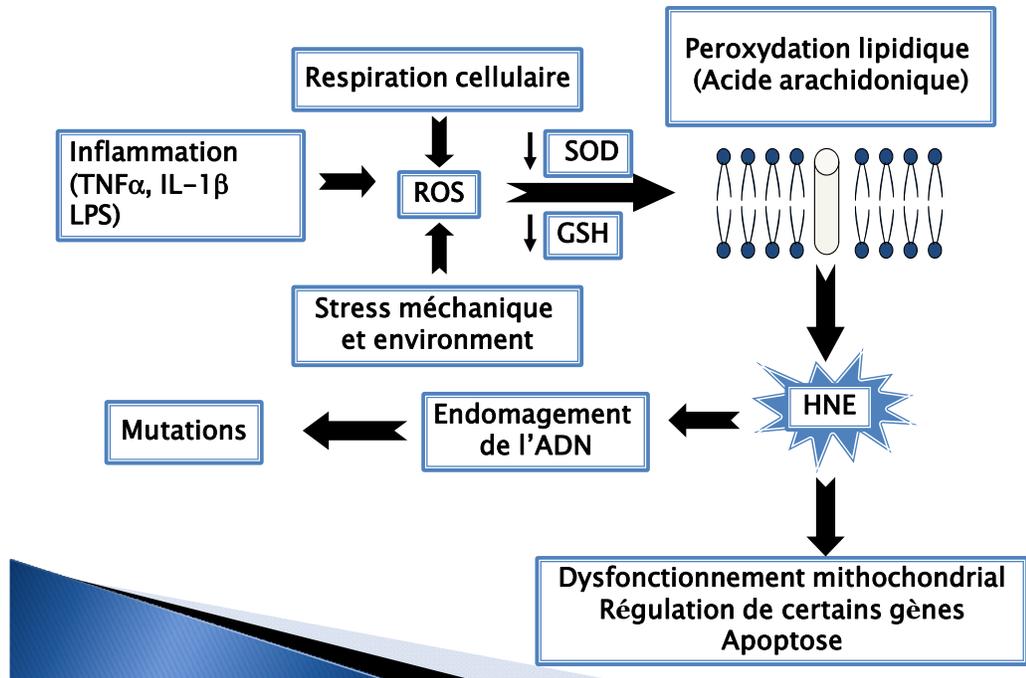


Figure 7 : Le stress oxydatif et le 4-Hydroxynonéal (HNE). Les radicaux libres d'oxygène sont capables d'attaquer la membrane cellulaire et induire la peroxydation lipidique qui aboutira à la production du HNE.

Ces derniers sont le plus susceptible à la peroxydation lipidique dû à la présence de la double liaison et du groupement méthylène (-CH₂-), dont l'atome d'hydrogène est fortement réactif ; ce qui facilite aux ROS de les attaquer tel que le HO[•]. Lors de la phase d'initiation le radical libre d'oxygène arrache un atome d'hydrogène du méthylène afin de former une molécule d'eau et produit ainsi un radical libre d'acide gras instable. Ensuite vient la phase de la propagation, vue l'instabilité du radical libre créé lors de l'étape précédente, celui-ci réagit avec une nouvelle molécule d'oxygène et produit une molécule intermédiaire aussi instable. Cette dernière molécule créée va agir par la suite avec une molécule du même genre ou avec une molécule d'oxygène et ainsi on aura un cycle vicieux où de nouveaux radicaux agiront de la même façon. Enfin, la phase terminale est caractérisée par une quantité élevée de radicaux libres afin d'obtenir la probabilité pour que deux radicaux agissent ensemble et ne plus engendrer de nouvelles molécules instables (Catala, 2006) (Figure 8). La peroxydation lipidique nuit au fonctionnement de la cellule, elle est capable de modifier la fluidité et la perméabilité de la membrane, elle peut changer le métabolisme de la cellule et causer des altérations au niveau du transport ionique à travers la membrane (Nigam and Schewe, 2000).

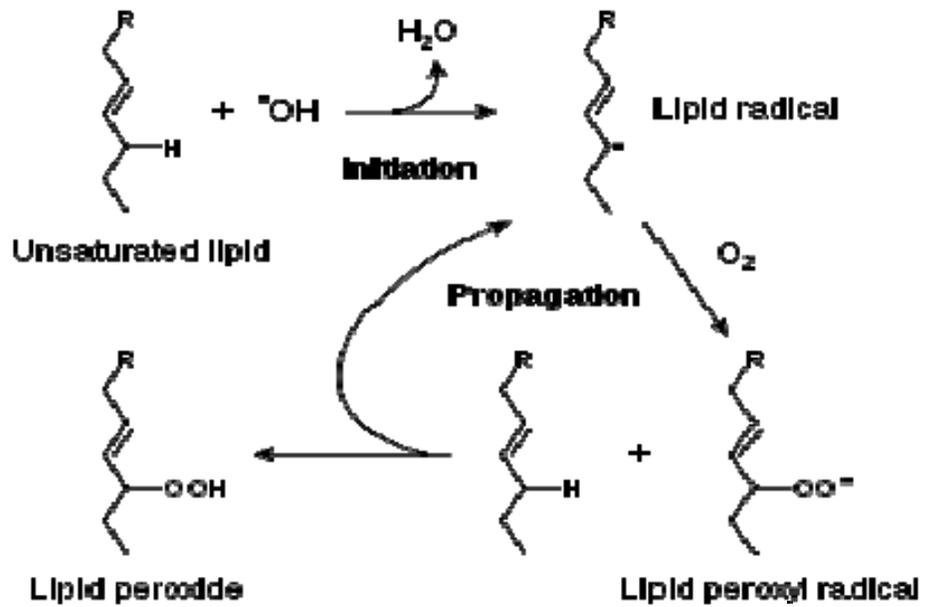


Figure 8: La peroxydation lipidique. Schéma montrant les différentes phases de la peroxydation lipidique.

La peroxydation lipidique engendre la production de plusieurs aldéhydes, les plus étudiés jusqu'à maintenant sont : le 4-Hydroxy-2-nonanal (HNE), le 4-Hydroxy-2-hexenal (HHE), le malonaldéhyde (Heimdal et al.) et l'acroléine. Tous comme les radicaux libres, ces aldéhydes se lient aux groupements nucléophiles des protéines, aux aminophospholipides et aux acides nucléiques. Leur longue durée de demi-vie les rends capables de propager leurs effets vers des cellules voisines. Le HNE est considéré l'aldéhyde principal formé lors de la peroxydation lipidique. Il est formé à partir des acides gras suivants : L'acide linoléique et l'acide arachidonique (Esterbauer et al., 1991; Uchida, 1999).

6.3.1- Le 4-Hydroxynonanal (HNE)

Le HNE est un constituant naturel des tissus membranaires des mammifères produit lors de la peroxydation lipidique. Il est devenu le centre d'intérêt de plusieurs études vu sa capacité à moduler les signaux de transduction et contribuer à la modification post-traductionnels de certaines protéines. Plusieurs études se sont intéressées au sujet du HNE libre et son pouvoir de nuire au fonctionnement de la cellule, tel que mis en évidence par une précédente étude de notre laboratoire (Vaillancourt et al., 2008). En outre, l'adduction de cet aldéhyde avec des biomolécules et l'altération de leur fonction n'a pas suscité beaucoup d'intérêts dans ces études. Alors, notre laboratoire s'est pris en charge d'étudier un aspect particulier de la liaison du HNE aux protéines menant à l'utilisation de la technique ELISA dans le but de quantifier les complexes HNE-protéines modifiées dans les liquides synoviaux et les extraits cellulaires provenant des patients atteints d'arthrose. La

particularité de la présente étude relève sur le fait que le HNE est capable de se lier au Col II et modifier ses propriétés, dans la perspective d'étudier sa contribution potentiel dans le développement de l'arthrose (Morquette et al., 2006; Shi et al., 2006; Vaillancourt et al., 2007). Le HNE est considéré comme un aldéhyde cytotoxique, un marqueur du stress oxydatif et comme un agent contribuant à la pathogenèse de différentes maladies, entre autre l'arthrose. Le HNE est une molécule relativement stable dû à la double liaison existante entre les carbones α et β , rendant ainsi le carbone γ déficient en électron. Cette caractéristique permet au HNE de se lier à différentes protéines cellulaires et altérer leur fonctionnement. La présence du HNE à faible concentration non toxique, peut réguler différentes fonctions cellulaires telle que les voies de signalisations, l'expression de certains gènes et la prolifération cellulaire. Dans des conditions physiologiques normales, la concentration du HNE varie entre 0.1 et 0.3 mM. En outre, cet aldéhyde s'accumule au niveau des membranes lors de l'augmentation du stress oxydatif et la concentration varie alors entre 10 μ M et 5 mM (Catala, 2009; Esterbauer et al., 1991; Uchida, 2003; Uchida et al., 1998) (Figure 9). Avec ses effets biologiques, il est considéré comme un modulateur patho-physiologique des signaux de transduction, de la régulation transcriptionnel et de la modification post-translationel (Bennaars-Eiden et al., 2002; Dianzani, 2003; Eaton et al., 1999). La modification post-traductionel est actuellement considérée comme le mécanisme majeure qui touche l'activité et les propriétés protéiques (Eaton et al., 1999; Vilardo et al., 2001). Le HNE a aussi le pouvoir de moduler plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription telles que la p38 MAPK, la protéine kinase C, le NF- κ B-p65, et l'AP-1 (activator protein-1). L'accumulation des protéines modifiées par le HNE au niveau des

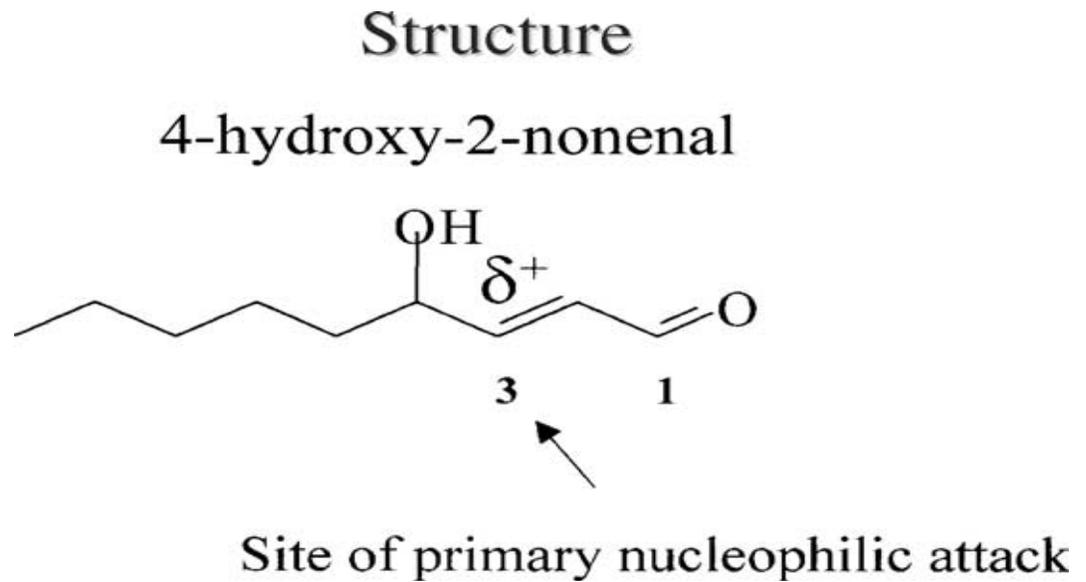


Figure 9 : La structure du 4-hydroxynonéal (HNE). Ce schéma montre l'emplacement des doubles liaisons qui rendent le HNE plus réactif (Schaur, 2003).

tissus est un processus dépendant de multiples facteurs, en plus de l'ampleur de la production de radicaux libres. Ces facteurs sont : (i) la capacité intrinsèque de la cellule à métaboliser le HNE libre ou lié en molécules non toxiques, par la réduction du HNE en 1-4-dihydroxynonene, ou par son oxydation en un acide 4-hydroxynonenoic ou par sa conjugaison avec le GSH (Aldini et al., 2003; Eaton et al., 1999; Ullrich et al., 1997) ; (ii) la susceptibilité de la dégradation protéolytique des protéines modifiées, par les protéasomes (Bulteau et al., 2001; Davies, 1987; Davies and Delsignore, 1987; Davies and Goldberg, 1987). La liaison du HNE aux protéines est réversible dans certaines conditions grâce à la réaction avec le GSH, mais dans la majorité des conditions cette liaison est irréversible. Les adduits HNE-protéines sont non seulement des marqueurs du stress oxydatif mais sont aussi responsables de la modification des fonctions cellulaires, de la modulation des signaux de transduction qui mènent à l'adaptation de la réponse cellulaire ou à l'apoptose. Ils sont responsables aussi de la modulation du système énergétique mitochondrial et de l'état redox (Benderdour et al., 2003; Brune et al., 1996; Chen et al., 1999; Leonarduzzi et al., 2000).

7- LA FORMATION DES COMPLEXES HNE/PROTÉINES

Les protéines sont la cible la plus importante du HNE, on estime que 1-8% du HNE formé par les cellules va certainement modifier les protéines (Siems and Grune, 2003). Le site de liaison des protéines au HNE est défini par plusieurs conditions, tels que la polarité du microenvironnement entourant et l'accessibilité au niveau de la structure tertiaire et

quaternaire des protéines. Ceci a été démontré par une étude qui a traité des myoglobines et des apomyoglobines par le HNE, ce qui a résulté en une modification accrue de l'apomyoglobines due à sa structure délogée (Siems and Grune, 2003). Une autre étude a mis en évidence l'impact de la polarité et l'accessibilité dans la modification des molécules d'actines. Parmi les différents résidus cystéine (Cys) existant au niveau du filament d'actine, seul la CYS-374 s'est liée au HNE vue sa structure « ouverte » et l'acidité du groupement thiol (influencé par l'environnement acide de la CYS-374). La modification des protéines par le HNE représente donc le mécanisme majeur qui influence les processus physiologiques et pathologiques au niveau de la cellule (Aldini et al., 2005a; Petersen and Doorn, 2004). Le HNE est un aldéhyde réactif, capable de modifier les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines. Le HNE possède trois groupements fonctionnels extrêmement réactifs qui confèrent à cet aldéhyde sa réactivité. La présence d'une double liaison entre deux carbones C=C et le groupement carbonyle C=O procure une charge positive au carbone 3. Cette charge est amplifiée dû à la présence de l'hydroxyle OH au niveau du carbone 4 (Poli and Schaur, 2000). En général, le HNE réagit plus avec les thiols et les groupements amines. Lors de la réaction Michael, on observe une addition nucléophile au niveau de la double liaison carbone C=C. Les composés ajoutés à cette double liaison sont les amino-lysines, les éthanols amine, les guanines et les groupes imidazoles, d'où la formation des complexes HNE-CYS, HNE-lysine ou HNE-histidine (Uchida, 2003). La formation de la base Schiff avec une amine primaire, par exemple avec une lysine, compétitionne avec la réaction Michael, ce qui facilite au HNE de se lier aux protéines (Schaur, 2003). Le HNE est capable de diminuer les activités enzymatiques, par

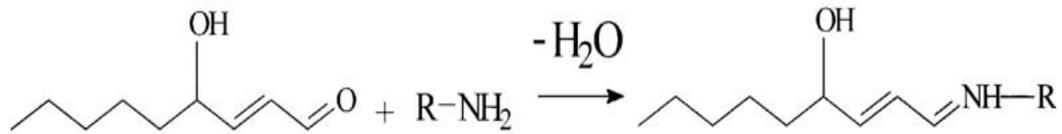
exemple il peut se lier au site actif de la lipoxigénase-1 et former ainsi un complexe Michael avec au moins une histidine et ligaturer le site actif de fer (Gardner and Deighton, 2001). Par ailleurs, il peut se lier à d'autres molécules telles que les lipides ou les acides nucléiques et altérer leur fonctionnement normal. En outre, de récentes études ont démontré que le MDA et le HNE sont capables de se lier au Col II au niveau articulaire et par la suite modifier ses propriétés fonctionnelles (Morquette et al., 2006; Tiku et al., 2003; Uchida et al., 1998) (Figure 10).

8- LA MODIFICATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE PAR LES PRODUITS OXYDATIFS

Les premiers signes indiquant le développement de l'arthrose sont la détérioration du réseau de collagène, représenté par un gonflement du tissu cartilagineux et la perte des protéoglycans (Bank et al., 2000; Maroudas, 1976). Ces dommages causés au cartilage affectent ses propriétés mécaniques, menant les chondrocytes à augmenter leur synthèse de protéoglycans et de collagène dans une tentative de réparer les dégâts causés (Nelson et al., 1998). Si l'équilibre entre la synthèse et la dégradation n'est pas établi, le dommage continu et aboutira à la dégénérescence du cartilage articulaire. Une des causes majeures contribuant au changement au niveau du cartilage articulaire est l'accumulation des produits de la glycation avancée (AGEs, advanced glycation end products) et de la peroxydation lipidique au niveau de ce tissu. Récemment, certaines études ont suggéré que l'accumulation des produits de la peroxydation lipidique au niveau de l'articulation pourrait contribuer énormément à la pathogenèse de l'arthrose, vu la capacité de ces molécules

a)

SCHIFF Base Formation



e.g. lysine

b)

MICHAEL Addition of Thiols

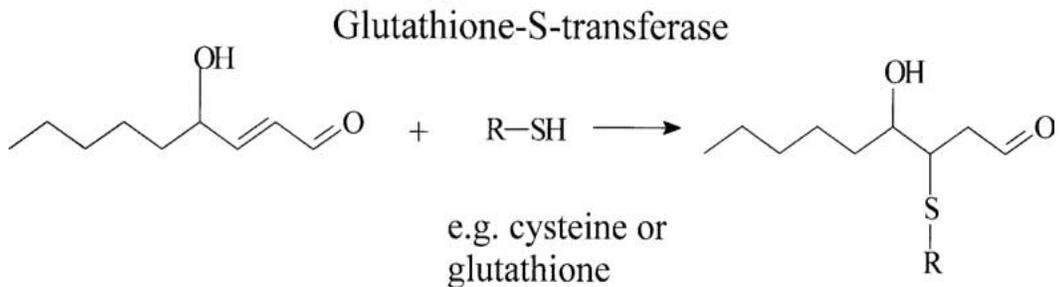


Figure 10: La complexation du 4-Hydroxynonéal (HNE) avec d'autres molécules. Ce sont deux réactions où le HNE se lie avec des amines (a) ou des thiols (b) (Schaur, 2003).

inorganiques et oxydantes à modifier les composantes de la matrice et en conséquence accélérer la dégradation du tissu (Morquette et al., 2006; Shah et al., 2005). De plus, l'implication des produits de la peroxydation lipidique dans le développement de l'arthrose a été mise en évidence par plusieurs études indiquant leur capacité à activer les MMPs par la formation des adduits avec cette enzyme au niveau du cartilage humain et leur pouvoir à oxyder le collagène articulaire chez le lapin (Morquette et al., 2006; Tiku et al., 2000). Il a été proposé que l'oxydation du collagène par les produits de la peroxydation lipidique *in vivo* affecte les propriétés biophysiques et biochimiques des fibres de collagène les rendant plus susceptible à la dégradation et contribuant ainsi au développement de l'arthrose. Donc, l'accumulation de ces produits oxydatifs au niveau articulaire promouvoit la libération des protéoglycans, l'expression des MMPs et la production des cytokines pro-inflammatoires. Au niveau osseux, les études se consacrent plus à l'accumulation des AGEs. Cette accumulation se répercute négativement dans la différenciation des ostéoblastes et dans la production des protéines de la matrice telles que le collagène et l'ostéocalcine (Fong et al., 1993; McCarthy et al., 2001). Il a été suggéré que l'accumulation des AGEs stimule l'apoptose des cellules souches mésenchymateuses humaines et par la suite limite la formation des tissus adipeux ainsi que la formation osseuse et cartilagineuse. De plus ces produits peuvent affecter la différenciation et la prolifération cellulaire (Kume et al., 2005; McCarthy et al., 2001). La modification de la matrice osseuse par les AGEs induit le recrutement des ostéoclastes et attire les monocytes via la sécrétion de cytokines comme l'IL-1 β , IL-6 et la TNF- α *in vitro* et *in vivo*. Ceci pourrait établir le lien entre l'accumulation des AGEs et la résorption osseuse (Miyata et al., 1996; Miyata et al., 1994).

9- HNE ET VOIES DE SIGNALISATIONS

On a longtemps cru que l'effet oxydatif du HNE se percute sur la modification des protéines et des composantes cellulaires, mais plus récemment on a mis en évidence que le HNE est capable non seulement d'altérer les structures et les fonctions des molécules mais d'affecter la voie de signalisation intracellulaire (Barrera et al., 1996; Esterbauer et al., 1991). Le HNE à des doses non toxiques, est capable d'augmenter la phosphorylation de la tyrosine, qui est accompagné d'une activation de la JNK et de la p38 MAPK (Parola et al., 1998; Uchida et al., 1999). L'activation du JNK promouvoit sa translocation au noyau où elle va activer plusieurs facteurs de transcriptions de la famille jun et fos. Une fois activés, ils vont activer la transcription de plusieurs gènes (Ruef et al., 1998; Uchida et al., 1999). Cette voie de signalisation joue un rôle très important dans la transduction du signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule tout en entraînant une cascade de phosphorylation. En effet, le HNE est capable de moduler l'expression de multiples gènes tels que le procollagène type I, le c-myc et le TGF- β 1 indépendamment de la voie des MAPKs, tels que la voie de la PKC (Chiarpotto et al., 1999), (Poli and Schaur, 2000). En outre, le HNE module la voie de la NF- κ B p65, qui joue un rôle très important dans la régulation des réponses immunes et inflammatoires. Le HNE empêche l'activation du NF- κ B p65 via l'inhibition de la phosphorylation de l'I κ B (Page et al., 1999). Minekura et al. ont démontré que la réduction de l'activité du NF- κ B p65 est associé à l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion, comme l'ICAM-1 et la VCAM-1 dans les cellules endothéliales aortiques (Minekura et al., 2001). Récemment, notre groupe de recherche a

rapporté que le HNE empêche la stimulation de l'iNOS par l'IL-1 β via l'inactivation du NF- κ B p65 par la formation des adduits HNE/I κ B kinase (Vaillancourt et al. 2007).

10- LES CHELATEURS DES PRODUITS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

Les composés carbonylés endogènes formés lors de la peroxydation lipidique et de la glycoxydation des hydrocarbures sont les précurseurs des produits finaux de ces réactions. Le taux de formation d'adduits avec les aldéhydes est faible dans des conditions physiologiques normales mais par contre augmente au cours du vieillissement et dans le cas d'une maladie chronique où le système antioxydant est inefficace (Dalle-Donne et al., 2003; Voss and Siems, 2006). En conséquence, on assiste à un dysfonctionnement progressive des protéines et à des dommages tissulaires, menant par la suite au développement de certaines pathologies dû entre autre à l'inflammation et l'apoptose (Dalle-Donne et al., 2003; Petersen and Doorn, 2004). D'où l'inhibition des modifications chimiques affligées aux protéines pourrait prévenir le développement des différentes pathologies et servira d'une stratégie thérapeutique aux patients. Plusieurs approches sont utilisées afin d'inhiber la génération des radicaux libres et en conséquence la formation des produits de la peroxydation lipidique tels que l'utilisation d'antioxydants et de chélateurs de métaux. De plus, l'utilisation des désactivateurs de carbonyle qui interagissent spécifiquement avec les aldéhydes et neutralisent la formation d'adduits a suscité un intérêt particulier. Negre-Salvayre et al. (Negre-Salvayre et al., 2008) ont revu les principaux agents pharmacologiques utilisés afin de neutraliser les produits de la peroxydation

lipidique. L'hydrazine est une molécule largement utilisée dans la synthèse de produits chimiques puisqu'ils se condensent rapidement avec les groupements carbonyles des cétones ou aldéhydes afin de former des groupements méthylène ou méthyle. Un autre exemple, est l'utilisation du DNPH (2,4-Dinitrophénylhydrazine) qui est un dérivé d'hydrazine, utilisé pour la détection du HNE dans les tissus et les fluides biologiques lors de l'application des techniques HPLC, immunohistochimies, spectrophotométries et Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-DNPH marqué (Esterbauer et al., 1991; Waeg et al., 1996). Le DNPH réagit avec les aldéhydes en milieu acide ce qui facilite la rupture des liaisons covalentes et par la suite leur liaison avec l'hydrazine pour former le dinitrophénylhydrazone (Esterbauer et al., 1991). Dans les études *in vitro* le DNPH prévient la formation et l'accumulation des adduits avec l'acroléine et le HNE dans des cultures de cellules vasculaires (Escargueil-Blanc et al., 2001). Par contre, *in vivo*, l'effet de cette molécule est limité à cause de ses propriétés mutagéniques et toxiques (Brook et al., 1997). Plusieurs autres molécules sont utilisées comme l'aminoguanidine et la pyridoxamine..., certaines sont parvenues au stade des études cliniques mais ont échoués comme le OPB-9195 ((+/-)-2-isopropilidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-yl) cetanilide), un dérivé de l'hydrazine, dû aux effets secondaires de ce composé en réduisant le niveau de la vitamine B6 (Peyroux and Sternberg, 2006). Notre projet c'est concentré sur l'étude de la carnosine qui semble être prometteuse, vue son effet bénéfique dans le dans le traitement de vieillissement et la maladie d'Alzheimer (Guiotto et al., 2005).

11- LA CARNOSINE : UN TRAPPEUR DE HNE

Vue l'implication du HNE dans la pathogenèse de différentes maladies telle que le diabète, l'athérosclérose et l'arthrose, la découverte d'une nouvelle molécule qui contrera son effet s'est avéré nécessaire. La carnosine (CAR) est un dipeptide (β -alanyl-L-histidine) présent naturellement au niveau des tissus tel que le muscle squelettique et cardiaque ainsi que dans le tissu nerveux à une concentration physiologique de 20 mM. Cette molécule possède différentes fonctions biologiques, elle est considérée comme un tampon physiologique, un stimulant du système immunitaire, un chélateur d'ions et un fixateur de radicaux libres (Aldini et al., 2002; Liu et al., 2003). Hipkiss et al. ont rapporté que la carnosine est capable d'inhiber la complexation de différents aldéhydes dérivant de la peroxydation lipidique par exemple le MDA limitant ainsi son effet néfaste (Hipkiss et al., 1997). Deux ans plus tard, Zhou et Decker démontrent que la carnosine en présence du HNE dans un milieu tamponné de phosphate mène à la formation du complexe HNE-CAR (Hipkiss et al., 1997; Zhou and Decker, 1999). L'adduction du HNE avec la CAR met en œuvre le groupement amine du résidu β -alanyl et le cycle imidazole du L-histidine qui agissent en synergie pour trapper le HNE. Dans le système biologique, le HNE se lie aux protéines via les groupements amines des résidus Lysine et Histidine, de même la CAR se lie au HNE par un mécanisme identique prenant ainsi la place des protéines. Plein d'études montrent que la CAR est une molécule endogène capable d'atténuer les quantités de HNE libre généré lors de la peroxydation lipidique d'où son rôle protecteur contre ses les effets néfastes (Aldini et al., 2002; Beretta et al., 2007).

12- OBJECTIF

Le stress oxydatif est un des facteurs jouant un rôle important dans la pathogenèse de l'arthrose causé par un déséquilibre entre le niveau intracellulaire des radicaux libres et celui des antioxydants. Dans différents tissus, l'effet cytotoxique des radicaux libres se traduit, en partie, par leurs capacités de générer les aldéhydes de la peroxydation lipidique, en particulier le HNE. Une des propriétés les plus connues du HNE est son grand potentiel à modifier les constituants de la MEC du cartilage, à savoir le Col II. Dans le cartilage, la MEC entourant les chondrocytes contribue à l'homéostasie de ce tissu. Ces cellules s'adhèrent à cette matrice via des molécules d'adhésion telles que les intégrines et l'ICAM-1. C'est grâce à ces molécules que les signaux parviennent aux chondrocytes du microenvironnement entourant. En conséquence, l'interaction entre la matrice et les cellules est importante pour la survie cellulaire et pour l'expression phénotypique et fonctionnelle des chondrocytes. Lorsque la MEC subit un changement que ce soit au niveau quantitatif ou qualitatif, cette interaction est perturbée et pourrait affecter le bon fonctionnement des chondrocytes. L'objectif de cette étude vise à démontrer que la modification des composantes de la matrice tels que le Col II affecte l'interaction entre les chondrocytes et la matrice et en conséquence induit des changements phénotypiques et fonctionnels de ces cellules, tel qu'observé durant le développement de l'arthrose. De plus, nous avons étudié l'effet protecteur d'un piègeur du HNE, à savoir la CAR, afin de renverser la modification du Col II par le HNE, et en conséquence rétablir le bon fonctionnement des chondrocytes.

13- HYPOTHÈSE

La peroxydation lipidique est impliquée dans la pathogenèse de différentes maladies, en occurrence l'arthrose. Un des produits les plus nuisibles de cette chaîne de réaction est le HNE. Plusieurs études ont démontré l'implication du HNE dans le développement de l'arthrose et sa capacité à modifier les constituants du cartilage tels que le Col II. Notre hypothèse proposée est que la fixation du HNE au Col II pourrait jouer un rôle dans la pathophysiologie de l'arthrose en perturbant l'interaction entre les chondrocytes et la MEC. Cette perturbation est causée par une altération de l'expression des molécules d'adhésion telle que les intégrines et l'ICAM-1. L'altération de l'expression de ces récepteurs aura un impact sur la survie et le phénotype cellulaires des chondrocytes et induit différentes voies de signalisations susceptibles d'être impliquées dans la régulation de la MMP-13 et la COX-2, deux importants facteurs qui jouent un rôle clé dans le développement de l'arthrose. Tous ces aspects cellulaires et moléculaires seront étudiés afin de mieux comprendre le pouvoir de la matrice à réguler l'homéostasie du tissu cartilagineux et le bon fonctionnement des chondrocytes. De plus, notre hypothèse sur la capacité de la carnosine à rétablir le phénotype et la fonction des chondrocytes sera aussi examinée.

CHAPITRE II: ARTICLE

Perturbation of Adhesion Molecule-mediated Chondrocyte-Matrix Interactions by 4-Hydroxynonenal Binding: Implication in Osteoarthritis Pathogenesis

Rana El-Bikai, Mélanie Welman, Hassan Fahmi, Qin Shi, Karim Maghni, Julio C. Fernandes, and Mohamed Benderdour

Orthopaedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal and Department of Surgery, University of Montreal, 5400 Gouin Blvd. West, Montreal, QC H4J 1C5, Canada

Running title: Extracellular matrix modification by 4-hydroxynonenal in osteoarthritis

ABSTRACT

OBJECTIVE: To investigate whether interactions between human osteoarthritic chondrocytes and 4-hydroxynonenal (HNE)-modified type II collagen (Col II) affect cell phenotype and functions and to determine the protective role of carnosine (CAR) treatment in preventing these effects.

METHODS: Human Col II was treated with HNE at different molar ratios (MR) (1:20 to 1:200; Col II: HNE). Articular chondrocytes were seeded in HNE/Col II adduct-coated plates and incubated for 48 h. Cell morphology was studied by phase-contrast microscopy. Adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and $\alpha 1\beta 1$ integrin at protein and mRNA levels were quantified by Western blotting, flow cytometry and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Cell death, caspase-8 activity, prostaglandin E₂ (PGE₂), metalloproteinase-13 (MMP-13), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) were assessed by commercial kits. Col II, cyclooxygenase-2 (COX-2), MAPK and NF- κ B-p65 levels were analyzed by Western blotting.

RESULTS: Col II modification by HNE at MR ~1:20, strongly induced ICAM-1, $\alpha 1\beta 1$ integrin and MMP-13 expression as well as extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) and NF- κ B-p65 phosphorylation without impacting cell morphology and viability or Col II expression. However, Col II modification with HNE at MR~1:200 altered chondrocyte morphology by evoking cell death and caspase-8 activity. It inhibited $\alpha 1\beta 1$ integrin and Col II expression as well as ERK1/2 and NF- κ B-p65 phosphorylation,

but, in contrast, markedly elicited PGE₂ release, COX-2 expression and p38 MAPK phosphorylation. All these effects were prevented by CAR, an HNE-trapping drug.

CONCLUSION: Our novel findings indicate that HNE-binding to Col II results in multiple abnormalities of chondrocyte phenotype and function, suggesting its contribution in osteoarthritis development. CAR was shown to be an efficient HNE-snaring agent capable of counteracting these outcomes.

INTRODUCTION

Articular cartilage is composed of chondrocytes embedded in an exquisitely-organized extracellular matrix (ECM) of collagen and proteoglycans. Chondrocytes, responsible for regenerating and maintaining cartilage, exist in a relatively-isolated environment, since this tissue lacks blood vessels, lymphatic structures and nerves [46]. The ECM is an important pleiotropic regulator of several fundamental cellular processes, such as migration, proliferation, and phenotypic expression [43]. Chondrocyte phenotype and function are partially controlled by their interactions with the surrounding ECM. These regulatory effects of ECM are mediated through cell surface “adhesion receptors” that support the attachment of cells to ECM molecules both *in vivo* and *in vitro*. At the cell surface, matrix receptors link the ECM to the cell interior through elements of the cytoskeleton and other component proteins of signal transduction pathways. In chondrocytes, the best-described families of cell surface receptors are the integrins as well as non-integrin receptors, including CD44 of the hyaluronan-binding protein family, annexin V, and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) [13;22]. Integrin attachment stimulates the formation of focal adhesion complexes, intracellular protein complexes that transduce signals from the ECM to intracellular effectors, such as the cytoskeleton [18]. Such receptors convey information from the ECM to the intracellular compartment, utilizing several signal transduction pathways. The binding of matrix components to cell surface receptors also establishes a pericellular pool of ECM molecules that may stabilize cell phenotype.

Osteoarthritis (OA), a chronic disorder affecting the elderly, is characterized by joint pain and disability. Deterioration of articular cartilage is a hallmark of OA pathogenesis [9].

Although the precise aetiology of this disease is still unknown, it is clear that the degradation of articular cartilage is mediated by various factors, such as the production of metalloproteinases (MMPs) and other products resulting from cellular activity that selectively impact the cartilage matrix [5;12]. Among them, lipid peroxidation (Hodgson et al.) end-products, such as 4-hydroxynonenal (HNE) and malondialdehyde (Heimdal et al.), are believed to play key roles in cartilage damage in OA [34]. Our previous study demonstrated, for the first time, that HNE level was significantly higher in synovial fluids and osteoblasts from OA patients than in normal subjects. We also reported that free HNE was capable of inducing catabolic and inflammatory responses in isolated OA chondrocytes and altering the cellular phenotype of OA osteoblasts. These responses were mediated by the modulation of a panoply of signalling pathways, including mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) [23;36;41]. Generally, free HNE most likely represents one of the main LPO products that can modulate physiological as well as pathological processes, as depicted beautifully in a recent, dedicated review [28]. Furthermore, the relevance of LPO products to OA pathogenesis was manifested by their ability to form adducts. By binding to proteins, HNE is capable of activating MMP-13 and increasing the susceptibility of type II collagen (Col II) to proteolytic cleavage by MMP-13 [23]. The formation of HNE/Col II was augmented in human cartilage treated with tumour necrosis factor-alpha (TNF α) and free radical donors. Tiku *et al.* reported that chondrocyte-derived LPO products mediate the oxidation of cartilage collagens [39]. They proposed that oxidative modification of cartilage collagen by aldehyde *in vivo* could result

in alteration of the biochemical and biophysical properties of cartilage collagen fibrils, making them prone to degradation and initiating the changes observed in aging and OA.

The present study was undertaken to clarify the significance of high levels of HNE-Col II adducts in OA cartilage. We established that interactions between OA chondrocytes and HNE-modified ECM protein (e.g. Col II) induced changes in cell phenotype and function, consequently contributing to cartilage damage seen during OA development. The beneficial effect of carnosine (CAR), an HNE-trapping drug, was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Specimen selection and chondrocyte culture

Post-surgery discarded human OA articular cartilage was obtained from OA patients (aged 67 ± 9 years mean \pm SD) who underwent total knee arthroplasty. Informed consent had been obtained from patients with OA for the use of their tissues for research purposes. All patients were evaluated by rheumatologists who followed American College of Rheumatology criteria [2]. The experimental protocols and use of human tissues were approved by the Research Ethics Board of Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

OA knee cartilage specimens were spliced and rinsed, and chondrocytes were extracted by sequential enzymatic digestion, as described previously [23]. Cartilage samples were digested with 1 mg/ml of pronase (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) for 1 h at 37°C, followed by 2 mg/ml of type IV collagenase (Sigma-Aldrich) for 6 h in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 100 units/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Invitrogen). The cells were seeded at high density in culture flasks at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air until they were confluent and ready for experimentation.

Plate coating and cell seeding

Human Col II (Sigma-Aldrich) was modified with HNE (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) at different molar ratios (MR) (1:20 to 1:200; Col II:HNE). 24-well plates (for cell suspensions) were coated with 0.1 mg/ml HNE-Col II adducts and incubated for 24

h at 4°C. They were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) to eliminate free HNE and conserved at 4°C until used. First-passage chondrocytes were distributed into pre-treated 24-well plates, as outlined above, at concentrations of 2×10^5 cells/cm² in 1 ml in DMEM containing 2% FBS , and incubated at 37⁰C for 48 h in a humidified atmosphere containing 5% CO₂/95% air.

Cell morphology and viability

Changes in cell morphology were studied by phase-contrast microscopy with a x20 objective after hematoxylin and eosin staining. Chondrocyte viability was evaluated as described previously [24] using 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide (MTT) assay in 96-well plates (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada) by incubating them with 0.5 mg/ml MTT reagent (Sigma-Aldrich) for 15 min at 37⁰C. Then, 100 µL of solubilization solution (0.04 M HCl-isopropanol) was added, formazan salt was dissolved, and absorbance was read at 570 nm with the micro-ELISA Vmax photometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Caspase-8 activity

Enzymatic caspase-8 activity was quantified with commercial kits as described previously [40]. After 48 h of incubation, the cells were lysed, and protein concentration of the supernatants was measured according to the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce, Rockford, IL, USA). Total proteins (50 µg) were reacted with 200 µM IETD-**p**NA substrate in the presence of 100 µL of reaction buffer. After 16 h of incubation at 37°C, **p**-

nitroanilide release was assayed at 405 nm for caspase-8 activity, expressed as a percentage of untreated cells.

Protein detection by Western blotting

20 µg of total proteins from chondrocyte lysates treated under the indicated conditions were loaded for discontinuous 4-12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. They were then transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) for protein immunodetection and semi-quantitative measurement [23]. The primary antibodies used were mouse anti-human ICAM-1, anti-human $\alpha 1\beta 1$ integrin and anti-human β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), or rabbit anti-human COX-2 (Cayman Chemical Company), anti-total and phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), p38 MAPK, and NF- κ B-p65 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). After serial washes, the primary antibodies were revealed by goat anti-mouse or anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). Immunoreactive proteins were detected with SuperSignal blotting substrate (Sun et al.) and exposed to Kodak X-Omat film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

Prostaglandin E2 (PGE₂) and MMP-13 determination

After incubating the chondrocytes for 48 h in collagen-coated plates, the medium was collected, and PGE₂ and MMP-13 levels were assessed by enzyme immunoassay (Cayman

Chemical Company) and ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Detection sensitivity was 9 and 8 pg/ml, respectively. All assays were performed in duplicate. Absorbance was measured with the micro-ELISA Vmax photometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated with TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). RNA was quantitated with RiboGreen RNA quantitation kits (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), dissolved in diethylpyrocarbonate-treated H₂O, and stored at -80°C until used. 1 µg of total RNA was reverse-transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada), as detailed in the manufacturer's guidelines. One-fiftieth of the reverse transcriptase reaction product was analyzed by real-time quantitative PCR. The following specific sense and antisense primers were purchased from Bio-Corp Inc. (Montreal, Quebec, Canada): human ICAM-1, 5'-CCT ATG GCA ACG ACT CCT TC-3' (forward) and 5'-TGC GGT CAC ACT GAC TGA G-3' (reverse); human α1 integrin, 5'-GGA GCA ATT CGA CGA GCA CT-3' (forward) and 5'-TTC ATC CCG CAG ATA CGC TA-3' (reverse); human β1 integrin, 5'-TTC AAT GCC ACC TGC CTC AA-3' (forward) and 5'-TTG GCC TCA ATG CTG AAG CTC-3' (reverse); human GAPDH, 5'-CAG AAC ATC ATC CCT GCC TCT-3' (forward) and 5'-GCT TGA CAA AGT GGT CGT TGA G-3' (reverse); human MMP-13, 5'-CTT AGA GGT GAC TGG CAA AC (forward) and 5'-GCC CAT CAA ATG GGT AGA AG

(reverse); human COX-2, 5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3' (forward) and 5'-AGT TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3' (reverse).

Quantitative PCR analysis was performed in a total volume of 50 μ l containing template DNA, 200 nM sense and antisense primers, 25 μ l of SYBR Green Master Mix (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), and 0.5 units of uracil-*N*-glycosylase (UNG, Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). After incubation at 50°C for 2 min (UNG reaction) and at 95°C for 10 min (UNG inactivation and activation of AmpliTaq Gold enzyme), the mixtures were subjected to 40 amplification cycles (15 s at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing and extension). Incorporation of SYBR Green dye into the PCR products was monitored in real-time with a Mx3000 real-time PCR system (Stratagen, La Jolla, CA, USA), allowing determination of the threshold cycle (C_t) at which exponential amplification of PCR products begins. After PCR, dissociation curves were generated with 1 peak, indicating amplification specificity. A C_t value was obtained from each amplification curve with software provided by the manufacturer (Stratagen).

Relative mRNA expression in chondrocytes was quantified according to the $\Delta\Delta C_t$ method, as detailed in the manufacturer's (Stratagen's) guidelines. A ΔC_t value was calculated, first by subtracting the C_t value for the housekeeping gene GAPDH from the C_t value for each sample. A $\Delta\Delta C_t$ value was then calculated by subtracting the ΔC_t value for the control (unstimulated cells) from the ΔC_t value for each treatment. Fold changes compared to the controls were then determined by $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Each PCR generated only the expected specific amplicon, as shown by melting temperature profiles of the final product and by gel

electrophoresis of the test PCRs. Each PCR was run in triplicate on 2 separate occasions for each independent experiment.

Flow cytometric analysis

Incubated cells in unmodified or HNE-modified Col II were trypsinized, centrifuged and then labeled with either 1 μg of a purified mouse IgG₁ isotype control (BD Biosciences PharMingen; San Diego, CA, USA), or mouse anti-human ICAM-1 (15.2) (Santa Cruz Biotechnology) in PBS/2% FBS for 60 min at 4°C. The cells were then washed twice in PBS and incubated with Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen) diluted 1/500 in PBS/2% FCS, for 30 min at 4°C in the dark. They were washed, re-suspended in 500 μl of PBS and analyzed. ICAM-1 surface expression on chondrocytes was assessed in a Coulter Epics XL flow cytometer with Expo32 software (Beckman Coulter System, Mississauga, Ontario, Canada).

MAPK and NF- κ B quantification

After 48 h of incubation, human OA chondrocytes were lysed, and protein levels were quantitated according to the BCA method. The samples were assayed with ELISA kits for total and phosphorylated p38, ERK1 (p44), ERK2 (p42), and NF- κ B-p65 (Cell Signaling Technology, Inc.). The data are expressed as fold induction

Statistical analysis

All quantitative results were calculated as mean \pm SEM. The data were analyzed by Student's unpaired t-test. $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

RESULTS

HNE-binding to Col II induces changes in cell morphology, viability and phenotype

To investigate the effect of HNE-binding to Col II on chondrocyte function, we first documented changes in cell morphology and viability by microscopy and MTT assay, respectively. After 48 h of incubation, Col II modification by HNE at high MR (1:200) (Fig. 1C) induced alterations in cell morphology compared to unmodified Col II or collagen exposed to HNE at low MR (1:20) (Fig. 1A & 1B). The changes in cell morphology were associated with cell viability decreased by 20% and caspase-8 activity increased by 50%, respectively (Fig. 1D). Thereafter, we evaluated the ability of HNE-modified Col II to affect chondrocyte phenotype via Col II protein expression. As illustrated in Figure 1E, Col II protein expression was reduced by 65% when the cells were seeded in Col II treated with HNE at a 1:200 MR, indicating altered cell phenotype. Col II modification with HNE up to 1:100 MR did not influence cell viability, caspase-8 activity and cell phenotype. These data indicate that interactions between human OA chondrocytes and HNE-Col II adducts influence cell morphology, viability and phenotype

HNE-binding to Col II modulates the expression of adhesion molecules (ICAM-1 and $\alpha 1\beta 1$ integrin)

Cell adhesion molecules are expressed on the cell surface and are involved in binding with other cells or with the ECM components. They play a critical role in a wide array of biological processes that include differentiation, viability, inflammation and catabolism. In the present study, we investigated both ICAM-1 and $\alpha 1\beta 1$ integrin in cultured chondrocytes

in HNE-modified Col II-coated plates. Compared to unmodified Col II, Col II modification with HNE at low MR (1:20) induced ICAM-1 expression at the protein (Fig. 2A) and mRNA (Fig. 2C) levels by 440 (p<0.001) and 400% (p<0.001), respectively. No change in ICAM-1 expression was observed when Col II was modified by HNE at a 1:100 or 1:200 MR.

We then undertook flow cytometric analysis to confirm the Western blotting and real-time PCR data. Figure 2B discloses that Col II modification by HNE at a 1:20 MR (Fig. 2B.b2) increased the percentage of cells expressing ICAM-1 by 2-fold at the surface of chondrocytes, compared to control cells (Fig. 2B.b1). When the data were analyzed for X-mean fluorescence intensity, almost a 10-fold increment in ICAM-1 expression was noted (Fig. 2B.b2). However, incubated cells with HNE-treated Col II at a 1:200 MR presented ICAM-1 expression levels comparable to those in control cells in terms of both cell percentage and X-mean fluorescence intensity (Fig. 2B.b3). Flow cytometry of ICAM-1 expression on chondrocytes in response to their incubation in HNE-modified Col II was in agreement with the Western blotting and real-time PCR data.

Furthermore, α 1 and β 1 integrin expression increased, in the same pattern, by 150 (p<0.05) and 160% (p<0.05) at the protein level (Fig. 2A) and by 230 (p<0.05) and 310% (p<0.01) at the mRNA level (Fig. 2C) when Col II was modified by HNE at a 1:20 MR. However, Col II modification with HNE at a 1:200 MR dramatically decreased the expression of both α 1 and β 1 integrin by ~85% (p<0.001) at the protein and mRNA levels (Fig. 2A & 2C). Collectively, these data suggest that inhibition of α 1 β 1 integrin expression will be involved in alterations of chondrocyte morphology, viability and phenotype, as observed in Figure 1.

Interactions between HNE-modified Col II and chondrocytes induce inflammatory and catabolic responses

In the next series of experiments, we investigated whether interactions between chondrocytes and their surrounding matrix, HNE-modified Col II, regulate the production of factors known to be involved in OA, such as PGE₂, a product of COX-2, and MMP-13. Our data revealed that HNE-modified Col II induced PGE₂ release and COX-2 expression. PGE₂ (Fig. 3A) peaked at 720 pg/ml (p<0.001), and COX-2 protein and mRNA (Fig. 3B & 3C) reached 480 and 350% (p<0.001), respectively, when Col II was treated with HNE at a 1:200 MR. We additionally established that HNE-modified Col II evoked a significant increase of MMP-13 but inversely to COX-2. MMP-13 protein and mRNA (Fig. 3D) reached maximum levels of 17 ng/ml (p<0.001) and 400% (p<0.001), respectively, when Col II was modified with HNE at a 1:20 MR. Taken together, these findings suggest that interactions between chondrocytes and HNE-modified Col II may contribute to the production of inflammatory and catabolic mediators known to be involved in OA.

HNE-binding to Col II activates p38 MAPK, ERK1/2 and NF-κB-p65

To gain insights into the signalling pathways activated during interactions between chondrocytes and HNE-modified Col II, we examined the HNE-induced phosphorylation patterns of MAPKs over extended time periods by Western blotting and ELISA. As shown in Figure 4A and 4B, our data indicate that p38 MAPK, ERK1/2 and NF-κB-p65 phosphorylation levels rose within 48 h of stimulation and depended on Col II alkylation

level. p38 MAPK activation peaked when Col II was modified by HNE at 1:200 MR (Fig. 4A and 4B.b1). In contrast, ERK1/2 (Fig. 4A, 4B.b2 and 4B.b3) and NF- κ B-p65 (Fig. 4A and 4B.b4) activation peaked when Col II was exposed to HNE at a 1:20 MR HNE and declined gradually thereafter when Col II was modified by HNE at a 1:100 or 1:200 MR. However, our results disclosed that interactions between cells and HNE-modified Col II evoked weak activation of c-Jun N-terminal kinase $\frac{1}{2}$ (JNK^{1/2}) (data not included).

CAR prevents HNE-modified Col II-induced chondrocyte functions

To establish whether HNE-modified Col II induced changes in cell morphology and function could be potentially reversed by CAR, an HNE-trapping drug, 0.1 mM CAR was added to HNE-modified, Col II-coated plates 1 h before cell seeding, and different factors were investigated. As seen in Figure 5, CAR prevented changes in cell morphology (Fig. 5A) and cell death (data not shown), when Col II was modified with HNE at a 1:200 MR. Interestingly, we observed that ICAM-1, α 1 β 1 integrin and Col II expression as well as PGE₂ and MMP-13 release were unchanged (Fig. 5B & 5C) when cells were incubated with HNE-modified Col II. These data indicated that CAR prevented changes in chondrocyte phenotype and function by establishing normal interactions between the cells and their surrounding matrix.

DISCUSSION

The main purpose of this study was to investigate interactions between human OA chondrocytes and HNE-modified Col II. When seeded in HNE-treated Coll II, significant amendment of chondrocyte morphology – from the typical chondrocyte-like polygon shape to rounded, semi-detached cells – was observed, mainly when Col II was modified by HNE at a 1:200 MR (Col II:HNE). Since morphological changes in cell shape are consistent with the induction of cell death, we studied cell viability and extrinsic caspase-8 activity. Our data disclosed that changes in cell morphology were accompanied by increased cell mortality, caspase-8 activation and loss of cell phenotype, as determined by Col II expression. Several authors have reported that fibroblast and osteoblast interactions with MDA-collagen or advanced glycation end product (AGE)-modified collagen affected both the morphology and proliferation of these cells, leading to reduced cell adhesion, migration and viability [27;32]. It has been proposed that changes in both the physical properties and charge profiles of protein are particularly important for the attachment of cells to collagenous basement membranes. To determine that chondrocyte morphology and phenotype were closely correlated with cell-matrix interactions through adhesion molecules, we first investigated ICAM-1 and $\alpha 1\beta 1$ integrin expression. Our results clearly showed that interactions between HNE-modified Coll II at a 1:20 MR and chondrocytes, probably through $\alpha 1\beta 1$ receptors, significantly increased its own expression, and was dramatically decreased thereafter when Col II was modified by HNE at a 200 MR. However, ICAM-1 expression was significantly enhanced by HNE-treated Col II at a 1:20 MR and then declined to the control level. Since Col II is a ligand for $\alpha 1\beta 1$ integrin, we

suggest that the increment of ICAM-1 expression is $\alpha 1\beta 1$ -dependent. The involvement of $\alpha 1\beta 1$ integrin in ICAM-1 expression was proposed by Nakayamada et al. [26], who postulated that the interaction of $\beta 1$ integrin with the ECM heightens ICAM-1 expression in synovial cells. In OA, integrin and ICAM-1 receptors play a critical role in maintaining cartilage homeostasis [14]. High ICAM-1 and $\alpha 1\beta 1$ integrin expression levels in the early stages of OA are indicated by several reports in humans and animals [14;15;19]. In adult joints, increased level of $\beta 1$ integrin was reported in osteoarthritic monkey cartilage compared to normal cartilage [19] and in human OA samples at minimally damaged locations compared to areas with more severe lesions [16]. Knee joints of $\alpha 1\beta 1$ -null mice display precocious proteoglycans loss, cartilage erosion associated with increased levels of MMP-2 and MMP-3 expression, and synovial hyperplasia [30;49].

Previous reports have demonstrated that ECM modification generates a panoply of signalling pathways implicated in various physiological and pathophysiological events [31]. To investigate this concept, we studied the possibility that HNE-modified Col II modulates catabolic and inflammatory responses known to be involved in OA through MAPK and NF- κ B activation. Our data clearly showed that low alkylation of Col II strongly activates ERK1/2 and NF- κ B-p65 and slightly activates p38 MAPK. However, high alkylation of Col II dramatically inhibits ERK1/2 and NF- κ B-p65 and strongly stimulates p38 MAPK. Collectively, our findings suggest that NF- κ B/ERK1/2 and p38 kinase oppositely regulate cell viability and adhesion in the presence of HNE-Col II adducts. Integrins control cell adhesion, migration, and survival by activating complex signalling networks that involve MAPK members, such as ERK [21]. Previous studies with

human chondrocytes have determined that activation of the β_1 integrin and subsequent ERK1/2 and NF- κ B signalling pathways is extremely important for cell differentiation and survival, and the inhibition of which can induce apoptosis [35;45]. Stupack et al. [38] suggested that “integrin-mediated death” is elicited by the cytoplasmic domain of unligated β_1 -integrin, resulting in caspase-8 recruitment to the cell membrane. In contrast, Wei et al. [44] found that p38 MAPK activity in chondrocytes is essential for the induction of cell death. p38 MAPK forms a complex with caspase-8 and consequently attaches to the death-executing machinery.

Collagen-binding integrin recognize the triple-helical RGD (arginine-glycine-aspartic) and GFOGER (glycine-phenylalanine-hydroxyproline-glycine-glutamate-arginine) sequences in major collagens. At the structural level, we can speculate that the inhibition of $\alpha_1\beta_1$ integrin expression by high alkylation of Col II in chondrocytes results from unligated $\alpha_1\beta_1$ integrin to Col II, possibly due to alteration of conformational alternation of Col II at RGD and GFOGER sites by HNE-binding. Consequently, $\alpha_1\beta_1$ integrin cannot ligate HNE-modified Col II, which leads to the accumulation of unligated $\alpha_1\beta_1$ integrin, subsequent recruitment of caspase-8, and inactivation of the ERK/MAPK signalling pathway. Previous reports have demonstrated that collagen and other ECM component adducted by MDA or AGEs may include the disruption of integrin binding to RGD sequences on collagen because of arginine modification, and possibly affecting cell-matrix interactions [3;6;37]. Although HNE has high reactivity with cysteine, histidine and lysine, it can form adducts with arginine. Hence, the order of reactivity of these amino acids with HNE reported in the

literature is: cysteine >> histidine > lysine >> arginine [7]. HNE reacts with arginine when all amino acid targets are modified by this aldehyde.

Since OA is associated with cartilage degradation and synovium inflammation, we investigated the ability of HNE-Col II adducts to induce catabolic and inflammatory genes. Among them, MMP-13 and COX-2 assumed a crucial role. We found that interactions between chondrocytes and the HNE-modified matrix specifically evoked MMP-13 by low Col II alkylation and COX-2 by high Col II alkylation. These data, combined with those on signalling pathways, suggest that MMP-13 and COX-2 expression depend mainly on ERK1/2 and p38 MAPK, respectively. It has been reported that Col I and fibronectin fragments induce MMP-13 expression in chondrocytes through ERK1/2 signalling via $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ integrin, respectively [8;18;33]. However, it has been observed that integrin-mediated adhesion to ECM proteins induces COX-2 synthesis involving signalling through the p38 MAPK pathway [42]. The role of AGE-modified proteins in OA has been demonstrated in previous studies. It has been found that AGEs significantly stimulate a panoply of signalling pathways mediating MMP-1, -3, and -13 expression [20;25;47]. These responses occur through receptors for AGEs, implicating those engaged in catabolic and inflammatory processes in OA.

Finally, we tested the hypothesis that CAR treatment is capable of inhibiting HNE-Col II adduct-induced changes in cell phenotype and function. The data revealed that CAR prevents changes in cell morphology, viability and function. CAR was previously found to directly trap HNE [17]. By trapping HNE in stable covalent adducts, CAR can inhibit HNE-induced protein cross-linking. Therefore, it has the ability to displace bound HNE off

the protein surface or to bind covalently into HNE-protein adducts. It is noteworthy that CAR can be covalently incorporated into glycated proteins, and consequently reduce protein carbonyl content [4]. In addition, CAR has been observed to reverse the physicochemical changes of proteins induced by glycation [48]. CAR, a dipeptide (b-alanyl-L-histidine), is considered to be a natural antioxidant and antiglycating agent that suppresses protein modifications by AGEs and LPO products [1;29]. It may play an important part as an anti-ageing molecule, since it can delay senescence in cultured fibroblasts and reverse the senescent phenotype in cultured human cells [10]. Furthermore, it is useful in preventing several diseases, as beautifully depicted in a recent, dedicated review [11].

CONCLUSION

Collectively, we presented evidence that Col II modification by HNE is capable of inducing changes in chondrocyte phenotype and function. Our results clearly showed that interactions between chondrocytes and HNE-Col II adducts, probably via adhesion molecules, strongly evoking a panoply of signalling pathways that trigger cell adhesion and viability as well as MMP-13 and COX-2 expression, as illustrated in Figure 6. The fact that HNE-Col II adducts elicited cell death and catabolic and inflammatory responses suggested their involvement in OA. CAR has been found to prevent the effects of HNE-Col II adducts, although the mechanism of action has not yet been elucidated. Further research is required to understand the implication of Col II modification by HNE and other ECM components in OA as well as the potential of HNE-trapping drugs in OA.

ABBREVIATIONS

CAR = Carnosine; Col II: Type II Collagen; COX-2 = Cyclooxygenase-2, HNE = Hydroxynonenal, ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule-1; LPO = Lipid peroxidation, MAPK = Mitogen-activated protein kinases; MMPs = Matrix metalloproteinases; NF- κ B = Nuclear factor-kappa B, OA = Osteoarthritis, PGE₂ = Prostaglandin E2,

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

REB performed the experimental study, contributed to preparation of the manuscript and undertook the statistical analysis. QS assisted in the experiments and in the isolation of chondrocytes from human cartilage. MW performed flow cytometry analysis. HF, KM and JCF evaluated and interpreted the data and assisted with preparation of the manuscript. MB designed the study, supervised the project, evaluated and interpreted the data, and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript

ACKNOWLEDGMENTS

Dr. M. Benderdour is a research scholar of the FRSQ. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Grant # IMH-90112).

Reference List

1. Aldini G, Facino RM, Beretta G, Carini M. **Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives.** *Biofactors* 2005, **24**:77-87.
2. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M. **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**:1039-1049.
3. Avery NC, Bailey AJ. **The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen.** *Pathol Biol (Paris)* 2006, **54**:387-395.
4. Brownson C, Hipkiss AR. **Carnosine reacts with a glycated protein.** *Free Radic Biol Med* 2000, **28**:1564-1570.
5. Dean DD. **Proteinase-mediated cartilage degradation in osteoarthritis.** *Semin Arthritis Rheum* 1991, **20**:2-11.
6. Dobler D, Ahmed N, Song L, Eboigbodin KE, Thornalley PJ. **Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification.** *Diabetes* 2006, **55**:1961-1969.
7. Doorn JA, Petersen DR. **Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal.** *Chem Biol Interact* 2003, **143-144**:93-100.
8. Forsyth CB, Pulai J, Loeser RF. **Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**:2368-2376.
9. Hamerman D. **The biology of osteoarthritis.** *N Engl J Med* 1989, **320**:1322-1330.
10. Hipkiss AR. **On the enigma of carnosine's anti-ageing actions.** *Exp Gerontol* 2009, **44**:237-242.
11. Hipkiss AR. **Chapter 3 carnosine and its possible roles in nutrition and health.** *Adv Food Nutr Res* 2009, **57**:87-154.

12. Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. **Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration.** *J Clin Invest* 1995, **96**:2859-2869.
13. Knudson W, Aguiar DJ, Hua Q, Knudson CB. **CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis.** *Exp Cell Res* 1996, **228**:216-228.
14. Knudson W, Loeser RF. **CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis.** *Cell Mol Life Sci* 2002, **59**:36-44.
15. Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, Grattagliano V, Covelli M, Patella V, Lo BG, Pipitone V. **Integrin expression on chondrocytes: correlations with the degree of cartilage damage in human osteoarthritis.** *Clin Exp Rheumatol* 1997, **15**:247-254.
16. Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, Grattagliano V, Covelli M, Patella V, Lo BG, Pipitone V. **Chondrocyte phenotyping in human osteoarthritis.** *Clin Rheumatol* 1998, **17**:99-104.
17. Liu Y, Xu G, Sayre LM. **Carnosine inhibits (E)-4-hydroxy-2-nonenal-induced protein cross-linking: structural characterization of carnosine-HNE adducts.** *Chem Res Toxicol* 2003, **16**:1589-1597.
18. Loeser RF. **Integrins and cell signaling in chondrocytes.** *Biorheology* 2002, **39**:119-124.
19. Loeser RF, Carlson CS, McGee MP. **Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage.** *Exp Cell Res* 1995, **217**:248-257.
20. Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, Chen H, Cole A, Im HJ, Bursch LS, Yan SD. **Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:2376-2385.
21. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. **Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:56-68.
22. Mollenhauer J, Mok MT, King KB, Gupta M, Chubinskaya S, Koepp H, Cole AA. **Expression of anchorin CII (cartilage annexin V) in human young, normal adult, and osteoarthritic cartilage.** *J Histochem Cytochem* 1999, **47**:209-220.
23. Morquette B, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC, Benderdour M. **Production of lipid peroxidation products in osteoarthritic tissues: new**

evidence linking 4-hydroxynonenal to cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 2006, **54**:271-281.

24. Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods* 1983, **65**:55-63.
25. Nah SS, Choi IY, Yoo B, Kim YG, Moon HB, Lee CK. **Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes.** *FEBS Lett* 2007, **581**:1928-1932.
26. Nakayamada S, Saito K, Fujii K, Yasuda M, Tamura M, Tanaka Y. **beta1 integrin-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and Fas on rheumatoid synovial cells and Fas-mediated apoptosis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:1239-1248.
27. Paul RG, Bailey AJ. **The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interactions.** *Int J Biochem Cell Biol* 1999, **31**:653-660.
28. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. **4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest.** *Med Res Rev* 2007, **28**:569-631.
29. Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW. **Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors.** *J Biol Chem* 2001, **276**:48967-48972.
30. Raducanu A, Hunziker EB, Drosse I, Aszodi A (2009) Beta1 integrin deficiency results in multiple abnormalities of the knee joint. *J Biol Chem* 284:23780-23792.
31. Rees MD, Kennett EC, Whitelock JM, Davies MJ. **Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies.** *Free Radic Biol Med* 2008, **44**:1973-2001.
32. Rittie L, Monboisse JC, Gorisse MC, Gillery P. **Malondialdehyde binding to proteins dramatically alters fibroblast functions.** *J Cell Physiol* 2002, **191**:227-236.
33. Ronziere MC, ubert-Foucher E, Gouttenoire J, Bernaud J, Herbage D, Mallein-Gerin F. **Integrin alpha1beta1 mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1746**:55-64.
34. Shah R, Raska K, Jr., Tiku ML. **The presence of molecular markers of in vivo lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:2799-2807.

35. Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, De SP, John T, Rahmanzadeh M, Rahmanzadeh R, Merker HJ. **Inhibition of mitogen-activated protein kinase induces apoptosis of human chondrocytes.** *J Biol Chem* 2001, **276**:13289-13294.
36. Shi Q, Vaillancourt F, Cote V, Fahmi H, Lavigne P, Afif H, Di Battista JA, Fernandes JC, Benderdour M. **Alterations of metabolic activity in human osteoarthritic osteoblasts by lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**:R159.
37. Slatter DA, Paul RG, Murray M, Bailey AJ. **Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen.** *J Biol Chem* 1999, **274**:19661-19669.
38. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA. **Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins.** *J Cell Biol* 2001, **155**:459-470.
39. Tiku ML, Shah R, Allison GT. **Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis.** *J Biol Chem* 2000, **275**:20069-20076.
40. Vaillancourt F, Fahmi H, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC, Benderdour M. **4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:R107.
41. Vaillancourt F, Morquette B, Shi Q, Fahmi H, Lavigne P, Di Battista JA, Fernandes JC, Benderdour M. **Differential regulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes through ATF-2/CREB-1 transactivation and concomitant inhibition of NF-kappaB signaling cascade.** *J Cell Biochem* 2007, **100**:1217-1231.
42. Viji RI, Kumar VB, Kiran MS, Sudhakaran PR. **Modulation of cyclooxygenase in endothelial cells by fibronectin: relevance to angiogenesis.** *J Cell Biochem* 2008, **105**:158-166.
43. von der MK, Gauss V, von der MH, Muller P. **Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.** *Nature* 1977, **267**:531-532.
44. Wei L, Sun XJ, Wang Z, Chen Q. **CD95-induced osteoarthritic chondrocyte apoptosis and necrosis: dependency on p38 mitogen-activated protein kinase.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**:R37.

45. Wu S, Flint JK, Rezvani G, De LF. **Nuclear factor-kappaB p65 facilitates longitudinal bone growth by inducing growth plate chondrocyte proliferation and differentiation and by preventing apoptosis.** *J Biol Chem* 2007, **282**:33698-33706.
46. Xu J, Wang W, Clark CC, Brighton CT. **Signal transduction in electrically stimulated articular chondrocytes involves translocation of extracellular calcium through voltage-gated channels.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**:397-405.
47. Yammani RR, Carlson CS, Bresnick AR, Loeser RF. **Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:2901-2911.
48. Yeargans GS, Seidler NW. **Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **300**:75-80.
49. Zemmyo M, Meharra EJ, Kuhn K, Creighton-Achermann L, Lotz M. **Accelerated, aging-dependent development of osteoarthritis in alpha1 integrin-deficient mice.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:2873-2880.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. HNE-binding to Coll II induces changes in chondrocytes morphology, viability and phenotype. 24-well plates were coated with 0.1 mg/ml human Col II and treated after with HNE at different molar ratios (1:20 to 1:200; Col II: HNE). After several washes, human OA chondrocytes were seeded at 2×10^5 cells/cm² and incubated up to 48 h. Cell morphology of cultured chondrocytes in untreated Col II (A), HNE-treated Col II at a 1:20 MR (B), and HNE-treated Col II at a 1:200 MR (C) was observed by phase contrast microscopy after hematoxylin and eosin staining. (D) Cell viability and caspase-8 activity were determined with MTT assay and commercial kit respectively. (E) Col II protein expression was analyzed in cellular extract by Western blot. The data are means \pm SEM of $n = 5$ and expressed as percentages of untreated cells. Student's unpaired t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 2. HNE-modified Col II modulates adhesion molecules expression in human OA chondrocytes. Cells were incubated as described in legend 1 and protein (A) and mRNA (C) levels of ICAM-1 and $\alpha 1\beta 1$ integrin were analyzed in cellular extracts by Western blot and real-time RT-PCR, respectively. (B) Protein expression of ICAM-1 was qualitatively evaluated by flow cytometry using mouse anti-human ICAM-1 and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG. Mouse isotype IgG1 was used as a negative control. (b1) untreated Col II, (b2) HNE-treated Col II at a 1:20 MR, (b3) HNE-treated Col II at a 1:200 MR. The data are means \pm SEM of $n = 4$ and expressed as percentages of untreated cells. Student's unpaired t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3. Interactions between human OA chondrocytes and HNE-modified Col II induced COX-2 and MMP-13 expression. Cells were incubated as described in legend 1 and culture media was collected. PGE₂ (A) and MMP-13 (D) release was assessed by enzyme immunoassay and ELISA kits. Levels of COX-2 protein (B) as well as COX-2 mRNA (C) and MMP-13 mRNA (D) were analyzed in cellular extracts by Western blot and real-time RT-PCR, respectively. The data are means \pm SEM of n = 6 and expressed as percentages of untreated cells. Student's unpaired t test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 4. Activation of MAPK and NF- κ B pathways by HNE-modified Col II in human OA chondrocytes. Cellular extracts from incubated chondrocytes (see legend 1) were subjected to assess total and phospho-p38 MAPK, ERK1 (p44), ERK2 (p42) and NF- κ B-p65 by (A) Western blot analysis using specific antibodies or by (B) ELISA procedure using commercial kit. (b1) p38 MAPK, (b2) ERK1, (b3) ERK2, (b4) NF- κ B-p65. The data are means \pm SEM of n = 4 and expressed as percentages of untreated cells. Student's unpaired t test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 5. Carnosine prevents HNE-modified Coll II-induced changes in chondrocytes phenotype and function. 0.1 mM carnosine was added to HNE-modified Col II-coated plates before cells seeding. (A) Cell morphology of human OA chondrocytes incubated in HNE-treated Col II at a 1:200 MR. (B) Cellular extracts were subjected to Western blot analysis to determine ICAM-1, α 1 β 1 integrin and Col II protein expression. (C) Culture

media from cultured cells was used to determine PGE₂ and MMP-13 levels. The data are means \pm SEM of n = 4 and expressed as percentages of untreated cells. Student's unpaired t test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Figure 6. Overview of different signalling pathways target genes expression-induced by interactions between cell and HNE-modified matrix.

Figure 1

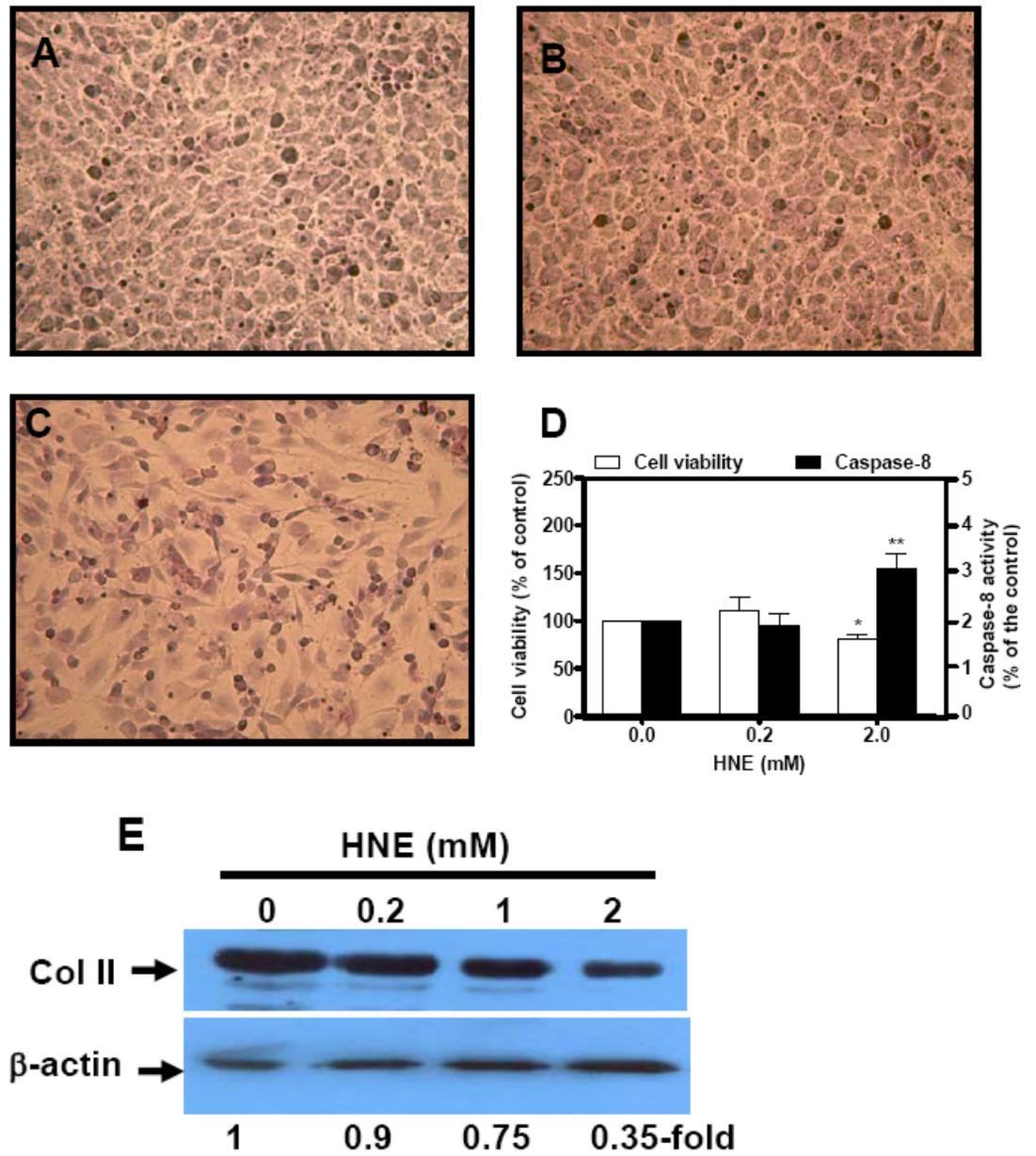


Figure 2

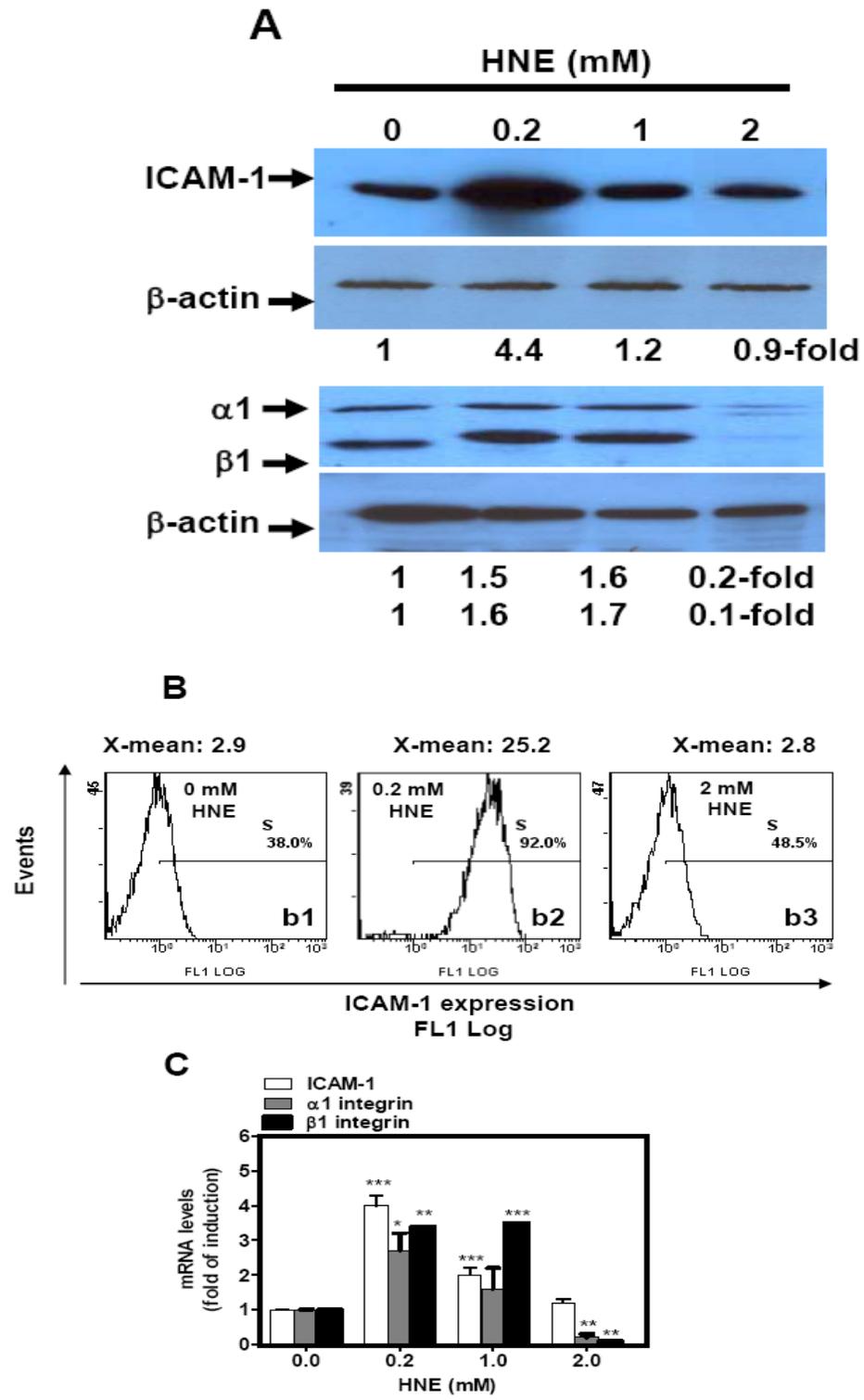


Figure 3

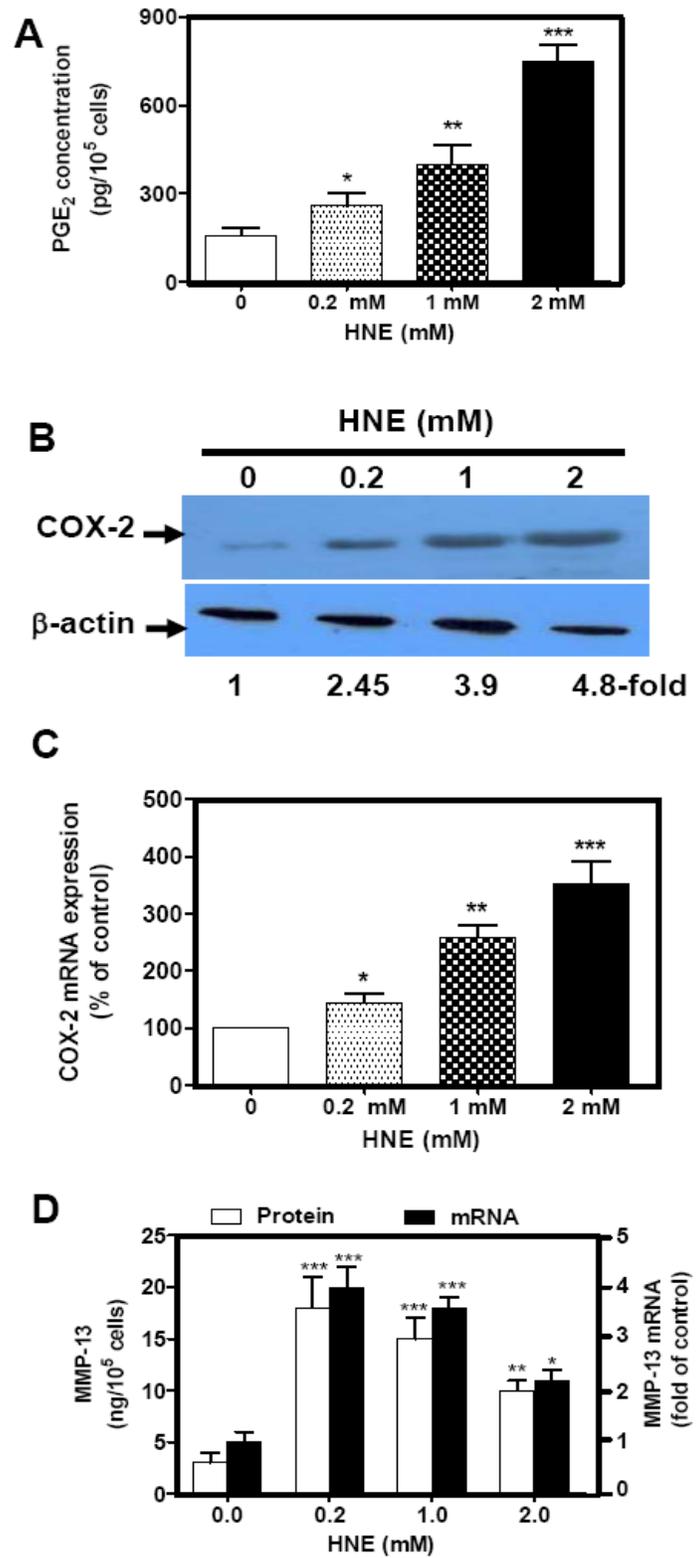


Figure 4

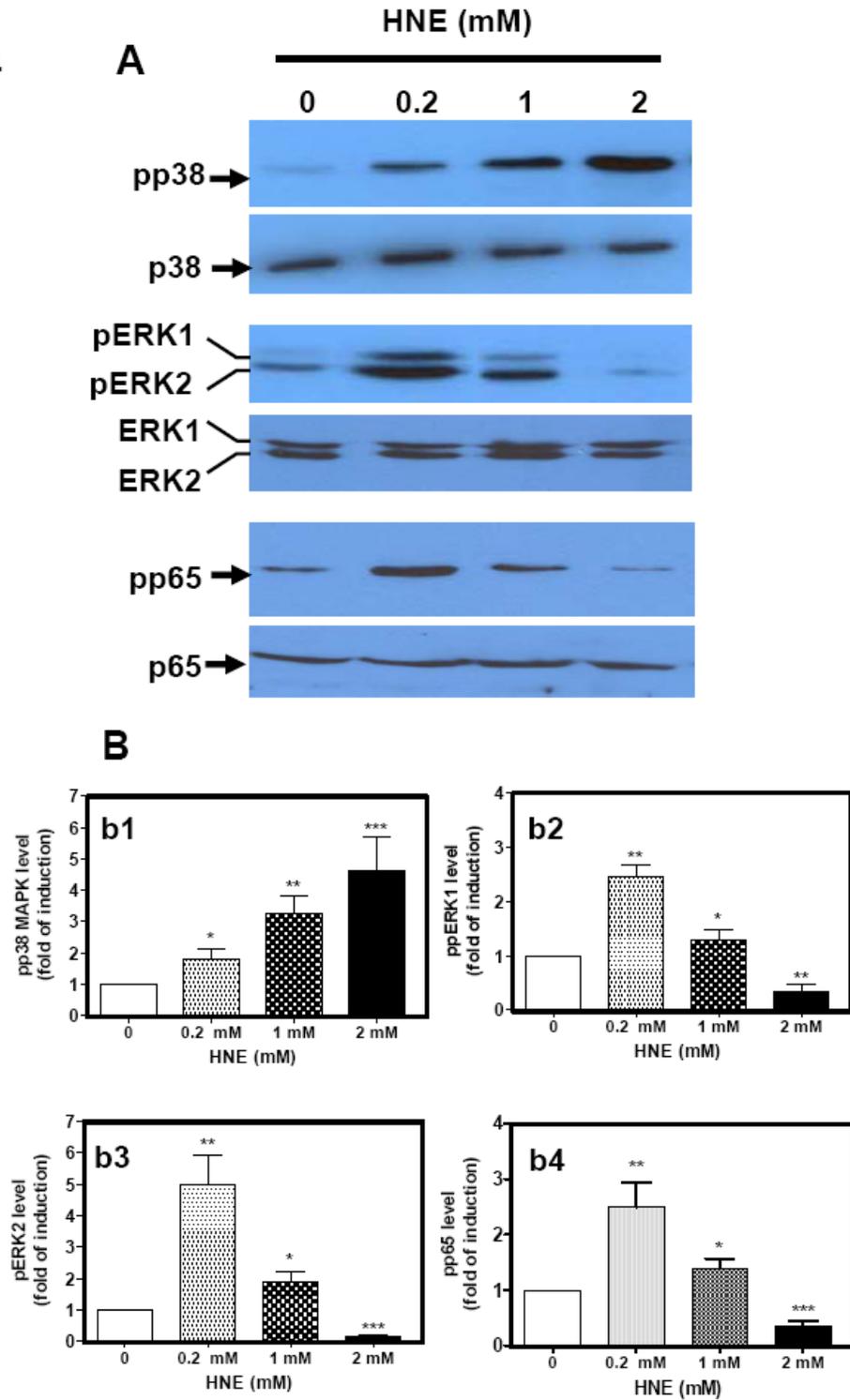


Figure 5

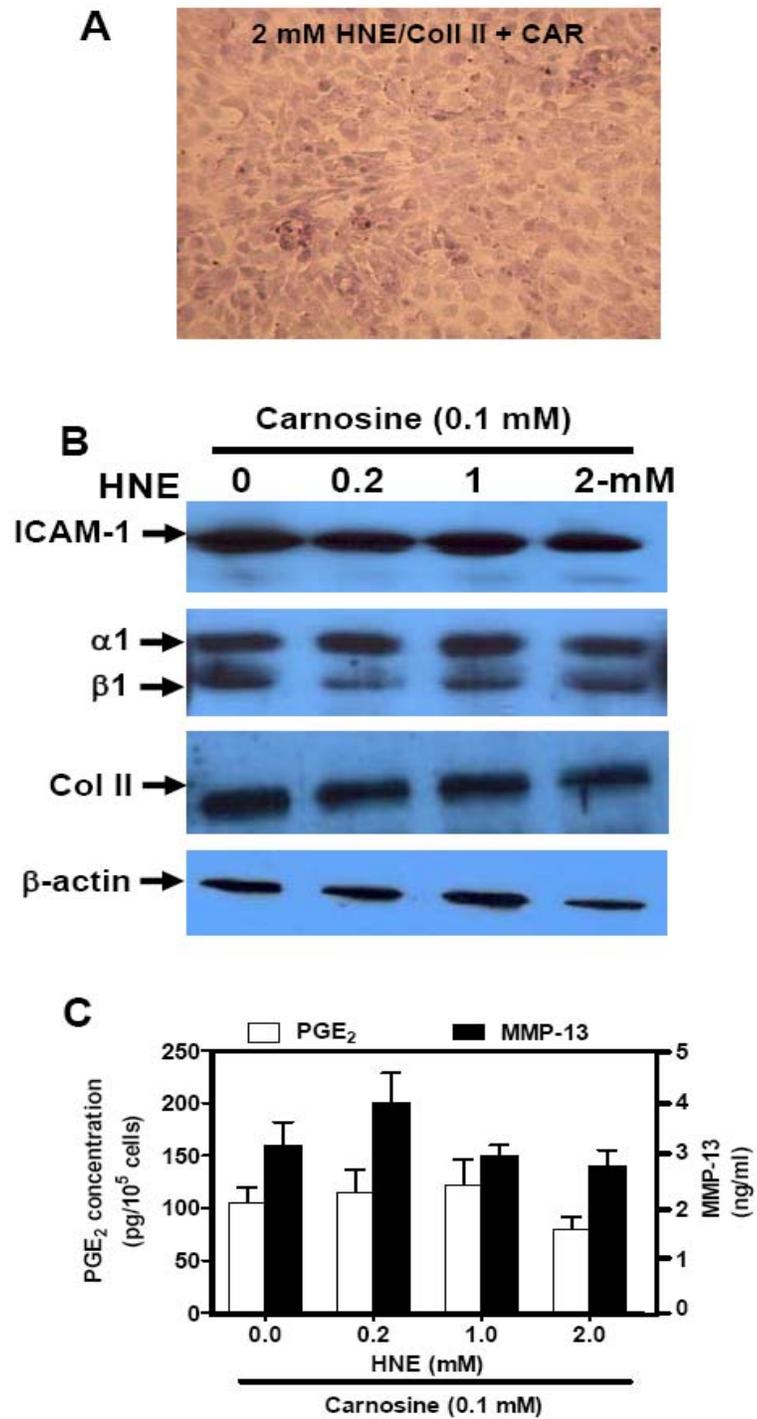
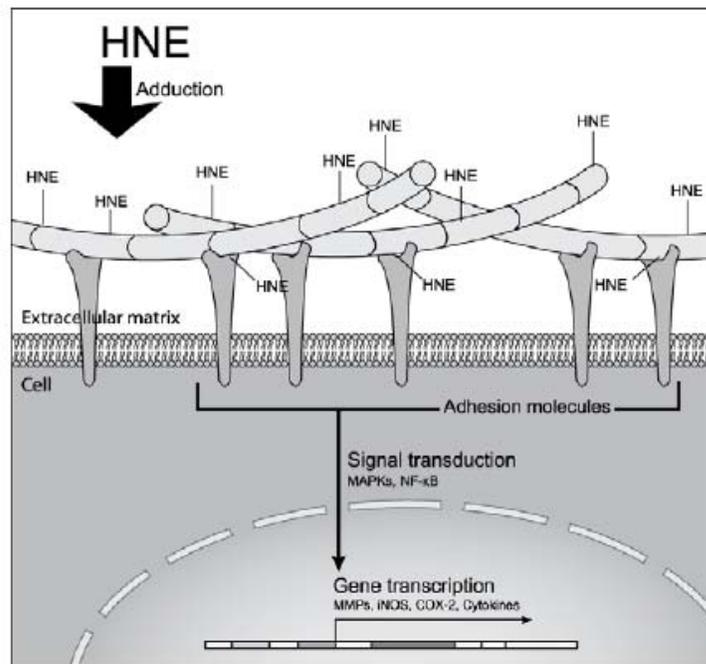


Figure 6



CHAPITRE III: DISCUSSION

Préambule

L'arthrose est une maladie chronique qui atteint les articulations, elle est une des maladies les plus fréquentes au Canada due au vieillissement de la population (Santé Canada). L'usure du cartilage et l'apparition des ostéophytes conduisent à des douleurs atroces, menant le patient à avoir recours à l'arthroplastie. De nombreuses études ont montré que le stress oxydatif contribue à la pathophysiologie de l'arthrose causée par une production accrue de ROS en particulier le NO et par un déficit du système antioxydant (Rathakrishnan and Tiku, 1993; Tiku et al., 1990; Tiku et al., 2000). Dans différents tissus, l'effet cytotoxique des ROS se traduit en partie par la production d'aldéhydes toxiques lors du processus de la peroxydation lipidique en particulier le HNE. La contribution de cet aldéhyde dans la pathophysiologie de l'arthrose a été mise en évidence par notre laboratoire. Nous avons rapporté que son niveau est augmenté dans les liquides synoviaux des patients atteints d'arthrose comparativement aux sujets normaux et dans les extraits de chondrocytes humains arthrosiques traités avec du $TNF\alpha$ et des donneurs de radicaux libres (Morquette et al., 2006). Au niveau transcriptionnel, le traitement des chondrocytes avec du HNE sous sa forme libre induit une panoplie de voies de signalisation impliquées dans la modulation des gènes cataboliques et inflammatoires à savoir la MMP-13, le Col II, l'iNOS et la COX-2 (Morquette et al., 2006; Vaillancourt et al., 2007). À forte concentration, il est cytotoxique et induit l'apoptose des chondrocytes via l'altération du métabolisme cellulaire et l'état redox (Vaillancourt et al., 2008). Au niveau post-traductionnel, et avec sa complexation avec des protéines, le HNE est capable d'activer la MMP-13 et d'augmenter la susceptibilité du Col II à la dégradation (Morquette et al., 2006). L'augmentation de la

susceptibilité du complexe HNE/Col II à la dégradation pourrait être expliquée par un changement de la structure protéique. Dans l'état normal, le Col II est résistant à la digestion par les collagénases. Cependant, une fois modifié par oxydation, le Col II devient très vulnérable à la dégradation à cause des altérations de sa structure primaire, secondaire et tertiaire (Davies, 1987; Greenwald and Moy, 1980; Monboisse et al., 1984). Fait intéressant, nous avons révélé que le niveau des complexes HNE/collagène type II est élevé dans le cartilage arthrosique ce qui suggère leur rôle dans la pathologie de l'arthrose. Nos données confirment celles de la littérature qui rapportent que le cartilage est la cible potentielle de plusieurs modifications par les AGEs et la MDA (Loeser et al., 2005a; Loeser et al., 2005b; Nah et al., 2007; Shah et al., 2005; Tiku et al., 2007) .

Altération de la viabilité cellulaire par les complexes HNE/Col II

Le but du présent travail dans le contexte d'un mémoire de maîtrise est d'investiguer la signification de l'augmentation des complexes HNE/Col II dans le cartilage arthrosique. Notre hypothèse était que la modification de la MEC du cartilage par le HNE affecte l'interaction entre les chondrocytes et la MEC et induit en conséquence des changements phénotypiques et fonctionnels de ces cellules telles qu'illustré dans la figure 11. Pour ce faire, les plaques de culture cellulaire ont été cotées avec du Col II puis traitées par la suite avec des concentrations croissantes de HNE (0.2 à 2 mM). Les chondrocytes humains arthrosiques sont ensuiteensemencés dans les plaques et incubés pendant 48 heures, et les changements phénotypiques et morphologiques de ces cellules sont étudiés.

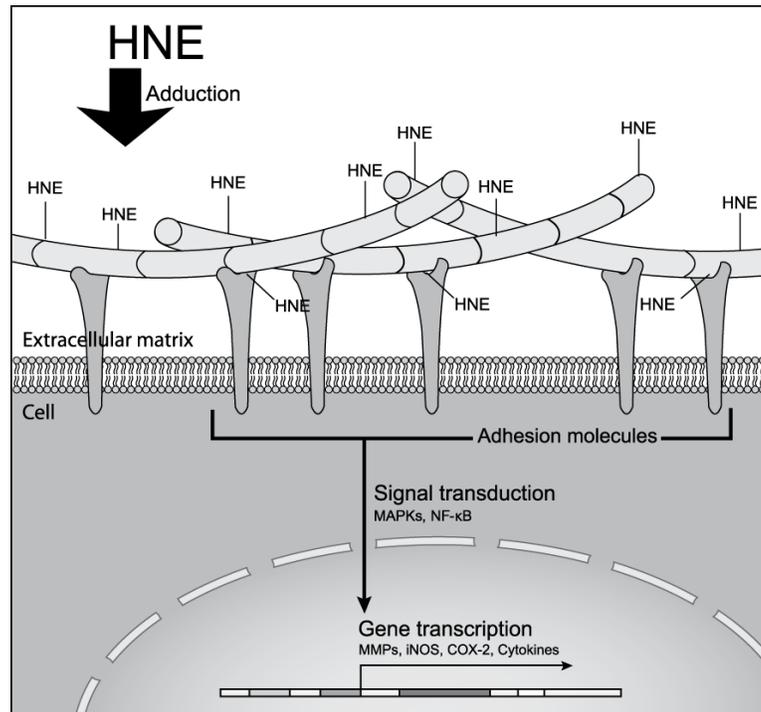


Figure 11 : Altération de l'interaction entre cellule et matrice extracellulaire modifiée par le 4-Hydroxynonéal (HNE). La modification du Col II par le HNE modifie l'interaction cellule/MEC via les molécules d'adhésion (intégrine et ICAM-1) et active par la suite une panoplie de voies de signalisation telle que les MAPK et la NF-κB-p65. En conséquence, plusieurs gènes connus pour être impliqué dans la pathogenèse de l'arthrose seront activés.

Les chondrocytes adhèrent à la MEC grâce aux molécules d'adhésion qui sont exprimées à leurs surfaces. Ces récepteurs transmettent les signaux provenant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, donc tout changement apporté à la matrice sera communiqué aux chondrocytes et modifiera ainsi leurs activités anaboliques et cataboliques (Knudson and Loeser, 2002).

Lorsqu'elles sont incubées avec du Col II modifié avec 2 mM HNE, les cellules changent de leur forme polygonal typique aux chondrocytes vers la forme ronde semi-détachée. Par la suite, on a voulu savoir si le changement dans la morphologie cellulaire est attribuée à la mort cellulaire telle que décrit dans la littérature. Nos résultats montrent belle et bien une diminution de la viabilité des chondrocytes de 20%, une augmentation de l'activité de caspase-8 et une perte du phénotype cellulaire tel qu'indiqué par le niveau d'expression du Col II. Plusieurs études ont rapportés que l'interaction entre les cellules fibroblastiques et ostéoblastiques avec le collagène type I modifié par le MDA ou les AGEs affecte la morphologie et la prolifération de ces cellules, et en conséquence diminue l'adhésion, la viabilité et la migration cellulaires (Paul and Bailey, 1999; Rittie et al., 2002). Il a été proposé que le changement dans les propriétés physiques des protéines ainsi que dans leurs charges soit déterminants dans l'adhésion de ces cellules sur le collagène.

Modulation de l'expression des molécules d'adhésion par les complexes HNE/Col II

Pour déterminer si les changements morphologiques et phénotypiques observés sont étroitement liés à l'interaction entre les cellules et le Col II modifié via les molécules

d'adhésion, nous avons déterminé premièrement l'expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ et l'ICAM-1 par Western Blot, RT-PCR en temps réel et par cytométrie de flux. Les résultats obtenus pour les deux récepteurs montrent que leur expression varie dépendamment de la concentration de HNE. L'interaction des chondrocytes avec le Col II modifié par 0.2 mM HNE, probablement via le récepteur naturel du Col II, les intégrines $\alpha 1\beta 1$, augmente sa propre expression de manière significative et celui de l'ICAM-1. Cependant, l'interaction de ces cellules avec le Col II modifié avec 2 mM diminue fortement l'expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ et maintient une expression de l'ICAM-1 égale au contrôle. Ces résultats indiquent premièrement que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est impliquée dans la régulation de l'ICAM-1 tel que rapporté par Nakayamada et al. ; et Hirai et al. (Hirai et al., 2007; Nakayamada et al., 2003a; Nakayamada et al., 2003b). Les auteurs ont suggérés que l'interaction entre l'intégrine $\beta 1$ et la MEC augmente l'expression de l'ICAM-1 dans les synoviocytes et les ostéoblastes via les voies GTPase Rho et la protéine kinase FAK (Focal Adhesion Kinase). Et deuxièmement, les résultats suggèrent aussi que les changements morphologiques sont attribués à l'inhibition de l'expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$.

Régulation du signal intracellulaire par les molécules d'adhésion : Implication dans l'arthrose

Dans l'arthrose, les intégrines et l'ICAM-1 jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du cartilage (Knudson and Loeser, 2002). Il a été observé que leur niveau augmente fortement dans l'étape précoce de la maladie, ce qui suggère fortement leur

implication dans le remodelage du cartilage arthrosique (Knudson and Loeser, 2002; Lapadula et al., 1997; Zemmyo et al., 2003). Par contre, l'interruption de l'interaction entre les molécules d'adhésion et leur matrice est largement associée à une dérégulation de l'homéostasie du cartilage articulaire et une accélération du développement de l'arthrose (Loeser et al., 1995; Zemmyo et al., 2003). Il a été démontré que les intégrines et l'ICAM-1 sont les principales molécules d'adhésion qui fournissent aux chondrocytes le moyen de détecter tous changements dans la composition de la matrice suite aux réponses mécaniques et inflammatoires et déclenchent par conséquent un signal intracellulaire (Chow et al., 1995; Knudson et al., 1996; Knudson and Loeser, 2002).

Plusieurs travaux ont indiqués que la modification de la MEC génère une panoplie de voies de signalisation qui seront impliqués dans plusieurs événements physiologiques et pathophysiologiques (Rees et al., 2008). Afin d'investiguer ce concept, nous avons étudié la possibilité que les complexes HNE/Col II modulent les réponses cataboliques et inflammatoires connues pour leur implication dans l'arthrose via la modulation des MAPKs et le NF- κ B-p65. Nos données montrent clairement que la modification du Col II par 0.2 mM HNE active fortement ERK1, ERK2, NF- κ B-p65 et faiblement la p38 MAPK. Cependant, la modification du Col II par 2 mM inhibe significativement l'activité de ERK1, de ERK2 et de NF- κ B-p65 et induit celle de la p38 MAPK. L'ensemble de ces données suggèrent que les voies ERK/NF- κ B-p65 et p38 MAPK régulent de manière opposés la viabilité et l'adhésion cellulaires lorsque les chondrocytes sont incubés avec les complexes HNE/Col II. Mitra et al. (Mitra et al., 2005) ont rapporté que les intégrines régulent l'adhésion et la survie cellulaires via l'activation de la FAK et les ERKs. Dans

l'étude de Stupack et al. (Stupack et al., 2001) il a été démontré que le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$ est responsable du maintien de la survie cellulaire via le recrutement ou pas de caspase-8 au niveau membranaire. D'autres travaux ont démontré que l'activation de GrB, des ERK et NF- κ B-p65 est extrêmement importante dans le maintien du phénotype et de la viabilité cellulaires des chondrocytes (Shakibaei et al., 1999). En outre, Wei et al ont observé que l'activité de la p38 MAPK est essentielle pour induire l'apoptose des chondrocytes via le gène CD95. La p38 MAPK est capable de former un complexe avec la caspase-8 et en conséquence s'attache au complexe « death-executing machine » (Wei et al., 2006).

Rôle de l'acide aminé arginine dans l'adhésion cellulaire

En se basant sur ces résultats obtenus, nous suggérons que la modification du Col II par 2 mM HNE perturbe sa reconnaissance par ses récepteurs, les intégrines $\alpha 1\beta 1$, au niveau membranaire des chondrocytes. Une des explications de cette perturbation est la possibilité de l'existence d'une altération structurale du Col II dû à la liaison du HNE aux niveaux des sites de reconnaissance tels que le site RGD (Arg-Gly-Asp) et le site GFOGER (Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg) (Barczyk et al.). Ces séquences sont reconnues par de nombreux membres de la famille des intégrines. Pour cela, les intégrines $\alpha 1\beta 1$ ne peuvent plus se lier à leurs ligands (le Col II modifié par le HNE). Ce qui mène : 1- à l'accumulation des intégrines libres non liées et ensuite leur inhibition. 2- au recrutement de la caspase-8 et à l'inhibition des voies des ERK1/2 et NF- κ B-p65. De nombreuses études ont démontré que la modification du collagène et les autres composantes de la MEC par le MDA ou l'AGEs

rompent leur liaison avec l'intégrine au niveau des séquences RGD sur le collagène, en raison de la modification du résidu Arg, affectant éventuellement les interactions cellulaires (Avery and Bailey, 2006; Paul and Bailey, 1999; Sakata et al., 2000; Slatter et al., 1999).

Les intégrines se lient à la triple hélice du collagène au niveau des séquences RGD ou GFOGER, mais leur capacité de reconnaître ces séquences *in vivo* est dépendante de l'état fibrillaire et l'accessibilité des domaines interactifs. Paul et Bailey (Paul and Bailey, 1999) ont démontré que l'interaction entre les ostéoblastes MG63 ou les fibroblastes HT1080 avec du collagène type I modifié par les AGEs réduit de façon significative l'adhérence cellulaire. Ceci a conduit à la conclusion que de telles modifications du collagène inhibent sérieusement les rapports MEC/cellule probablement par la perte fonctionnelle spécifique du résidu Arg impliqué dans l'attachement de l'intégrine à son ligand. La modification des résidus arginine des protéines de la MEC par des réactions non enzymatique est un mécanisme plausible pour l'inhibition des interactions MEC/cellule (Pedchenko et al., 2005; Plow et al., 2000; Ruoslahti, 1996). L'arginine est présente dans un certain nombre de sites de liaison de l'intégrine et joue un rôle essentiel dans l'attachement des cellules à leur MEC. Rappelons que le HNE possède des propriétés chimiques afin de se fixer essentiellement sur les résidus CYS, LYS, et HIS. Cependant, d'autres études ont identifié que l'arginine pourrait être aussi la cible du HNE. L'ordre de réactivité des différents acides aminés avec le HNE est proposé comme suite : CYS >> HIS > LYS >> Arg (Doorn and Petersen, 2003). Le HNE réagit avec l'Arg lorsque toutes les cibles d'acides aminés ont été modifiées par cet aldéhyde. Dans nos résultats, la modification de cet acide aminé pourrait

se faire uniquement lorsque la concentration du HNE est importante, dans notre cas à 2 mM.

Interaction entre les chondrocytes et le Col II modifié par le HNE induit des réponses inflammatoires et cataboliques

Dans un deuxième volet de cette étude, nous avons investigué la contribution de la formation des complexes HNE/Col II dans la régulation de deux processus impliqués dans l'arthrose : catabolisme et inflammation. Dans cet objectif, nous avons étudié la régulation de la MMP-13 et la COX-2 vue leur implication respective dans la dégradation du cartilage articulaire et dans l'inflammation de la membrane synoviale. Pour la première fois, nous avons mis en évidence une forte stimulation de l'expression de la MMP-13 lorsque les chondrocytes interagissent avec le Col II modifié avec 0.2 mM HNE. Cependant, l'induction de la COX-2 atteint son maximum lorsque les cellules sont incubées avec le Col II modifié avec 2 mM. Dans une tentative de combiner ces résultats avec ceux des voies de signalisation, nous suggérons que l'expression de la MMP-13 et de la COX-2 dépend en grande partie de l'activation des ERK1/2 et de la p38 MAPK respectivement. D'après les études menées sur des chondrocytes, le collagène et la fibronéctine induisent la voie des ERK1/2 nécessaires à l'augmentation de l'expression de la MMP-13 via les récepteurs $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ respectivement (Forsyth et al., 2002; Loeser, 2002; Ronziere et al., 2005). Les auteurs ont déterminé que ERK1/2 et JNK kinases ont été nécessaires pour l'induction de l'expression de la MMP-13 par le collagène. Toutefois, il a été rapporté que l'augmentation de l'expression de la COX-2 par la fibronéctine dépend de l'intervention des intégrines

$\alpha 5\beta 1$ via l'activation de voie p38 MAPK (Viji et al., 2008). Par ailleurs, le rôle des protéines modifiées par les AGEs dans l'arthrose a été signalé par plusieurs travaux antérieurs. Il a été constaté que les AGEs stimulent significativement une panoplie de voies de signalisation qui contribue à l'expression de la MMP-1, -3 et -13, et TNF (Loeser et al., 2005b; Nah et al., 2007; Yammani et al., 2006). Ces réponses sont médiées par des récepteurs spécifiques des AGEs (Belfrage), indiquant le rôle important de ces récepteurs dans les processus cataboliques et inflammatoires dans l'arthrose. L'augmentation des adduits HNE/Col II dans le cartilage arthrosique et la capacité de ces adduits à induire l'expression de la MMP-13 et de la COX-2 et plusieurs voies de signalisation à savoir les MAP kinase et le NF- κ B-p65 dans des chondrocytes suggère leur possible implication dans l'arthrose.

Les altérations du phénotype et de la fonction cellulaire sont normalisées par la carnosine

Dans la dernière partie de cette étude, nous avons voulu tester la capacité de renverser les effets observés du Col II modifié par la CAR, un puissant piègeur du HNE. La CAR comme déjà décrit dans la partie introduction est capable de fixer cet aldéhyde et limiter ces effets (Hipkiss et al., 1997; Zhou and Decker, 1999). Les plaques cotées de collagène modifié par le HNE ont été préalablement traitées avec 0.1 mg/ml de CAR solubilisé dans du PBS pendant une heure avant que les chondrocytes soitensemencées. Les résultats montrent clairement que la CAR empêche les changements phénotypiques des chondrocytes mesurées par leur niveau d'expression du Col II et normalise celle des

molécules d'adhésions (l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ et l'ICAM-1). Ces dernières sont exprimées d'une manière homogène dans toutes les conditions. Fait intéressant, la stimulation de la MMP-13 et de la COX-2 obtenue auparavant est bloquée par la CAR. De plus, aucun changement dans la morphologie cellulaire n'est observé. Le traitement de la MEC par la CAR a permis de masquer le HNE inhibant ainsi son action sur les chondrocytes. La CAR a permis de rétablir l'homéostasie de l'interaction entre les cellules et la MEC limitant ainsi les effets du HNE.

Les propriétés de la CAR lui permettent de piéger directement le HNE ou de retirer le HNE à partir des protéines déjà modifiées (Liu et al., 2003). Il est important de noter aussi que la CAR peut neutraliser les protéines modifiées par incorporation directe au site de la protéine modifiée. Ce processus est connu sous le nom carnosinylation. Ce phénomène a été rapporté récemment lorsqu'on a observé une incorporation covalente de cette molécule dans les protéines glyquées et avec une diminution concomitante de la teneur en protéines carbonylées (Brownson and Hipkiss, 2000). En outre, la CAR a été constaté d'inverser les modifications physico-chimiques des protéines induites par la glycation, bien que ce mécanisme n'a pas encore été élucidé (Yeargans and Seidler, 2003). La CAR est un dipeptide (b-alanyl-L-histidine) considéré comme un produit naturel ayant des propriétés antioxydantes et anti-glycation. Elle surprime la formation des AGEs et chélate de nombreux métaux (Price et al., 2001). De plus, le dipeptide peut réagir avec un certain nombre d'aldéhydes de la peroxydation lipidique (à savoir, l'acétaldéhyde, l'acroléine, le formaldéhyde, le MDA et le HNE) et ainsi supprimer leur toxicité (Aldini et al., 2005b). La CAR exerce un rôle important comme agent anti-vieillissant via sa capacité de retarder la

sénescence des fibroblastes en culture. En outre, il améliore la fonction cardiaque et la santé des yeux et il est utile dans la prévention du cancer ainsi que d'autres troubles neurologiques tels que l'autisme, la maladie de Parkinson comme bien illustré dans une revue dédiée récente (Hipkiss, 2009).

CHAPITRE IV : CONCLUSION

Cette étude a permis de démontrer l'importance de la formation des complexes HNE/Col II dans le cartilage arthrosique humain. Dans le cartilage, les chondrocytes jouent un rôle central en contribuant au maintien de l'homéostasie via leur interaction avec les composantes de la MEC. Dans l'arthrose, le maintien de l'homéostasie est compromis dû aux modifications qualitatives et quantitatives de la matrice aboutissant à des changements dans le phénotype et le fonctionnement des chondrocytes. Nos résultats montrent que la modification du Col II par les produits finaux de peroxydation lipidique, à savoir le HNE, a initié les chondrocytes à entreprendre une panoplie d'action anormale qui se résume par un changement morphologique et fonctionnel. On a observé un changement dans la morphologie et une induction de la mort cellulaire par apoptose. Nous avons démontré que ces effets sont médiés par une diminution de l'expression des molécules d'adhésion lorsque le Col II est modifié avec une forte concentration de HNE (2 mM). Nous avons pu mettre en évidence l'augmentation de la MMP-13 et la COX-2, deux gènes clés impliqués dans la régulation des réponses cataboliques et inflammatoires respectivement dans l'arthrose. Le traitement du collagène par la CAR a renversé les effets de la matrice modifiée par le HNE, limitant ainsi les changements dans le phénotype et dans la fonction des chondrocytes.

C'est une première étude à démontrer l'implication du HNE sous sa forme liée avec le Col II dans la pathophysiologie de l'arthrose. Nos résultats apportent de nouvelles connaissances sur le rôle de la MEC du cartilage à maintenir le phénotype et à assurer le bon fonctionnement des chondrocytes.

Plusieurs perspectives s'offrent suite à cette nouvelle approche. L'étude de la modification des composantes du cartilage par le HNE autres que le Col II telles que la fibronéctine et les protéoglycans restent à être investigués. Il s'avère aussi intéressant de pousser la

compréhension du rôle bénéfique de la CAR observé dans ce projet. Le traitement avec la CAR est une thérapie très prometteuse mais qui nécessite certainement plus d'études *in vivo*.

Bibliographie

- Ackerman, W.E., 3rd, and M. Ahmad. 2000. Lumbar spine pain originating from vertebral osteophytes. *Reg Anesth Pain Med.* 25:324.
- Acworth IN, M.D., Maher TJ. 1997. The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants. In oxidants, Antioxydants, and Free Radicals. Baskin SI, Salem H, eds, pp-23-77. Taylor & Francis, Washington, DC.
- Aigner, T., S. Soeder, and J. Haag. 2006. IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *Eur Cell Mater.* 12:49-56; discussion 56.
- Aldini, G., M. Carini, G. Beretta, S. Bradamante, and R.M. Facino. 2002. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction? *Biochem Biophys Res Commun.* 298:699-706.
- Aldini, G., I. Dalle-Donne, G. Vistoli, R. Maffei Facino, and M. Carini. 2005a. Covalent modification of actin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): LC-ESI-MS/MS evidence for Cys374 Michael adduction. *J Mass Spectrom.* 40:946-54.
- Aldini, G., R.M. Facino, G. Beretta, and M. Carini. 2005b. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *Biofactors.* 24:77-87.
- Aldini, G., P. Granata, M. Orioli, E. Santaniello, and M. Carini. 2003. Detoxification of 4-hydroxynonenal (HNE) in keratinocytes: characterization of conjugated metabolites

- by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 38:1160-8.
- Avery, N.C., and A.J. Bailey. 2006. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol Biol (Paris)*. 54:387-95.
- Awasthi, Y.C., E. Beutler, and S.K. Srivastava. 1975. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 250:5144-9.
- Bailey, A.J., T.J. Sims, and L. Knott. 2002. Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:176-82.
- Ballock, R.T., and R.J. O'Keefe. 2003. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 69:123-43.
- Bank, R.A., M. Soudry, A. Maroudas, J. Mizrahi, and J.M. TeKoppele. 2000. The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. *Arthritis Rheum.* 43:2202-10.
- Banse, X., T.J. Sims, and A.J. Bailey. 2002. Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J Bone Miner Res.* 17:1621-8.
- Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg. Integrins. *Cell Tissue Res.* 339:269-80.
- Barrera, G., S. Pizzimenti, A. Serra, C. Ferretti, V.M. Fazio, G. Saglio, and M.U. Dianzani. 1996. 4-hydroxynonenal specifically inhibits c-myb but does not affect c-fos expressions in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 227:589-93.
- Barrett, A.J. 1994. Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* 244:1-15.

- Belfrage, H. 1991. The crime preventive effect of psychiatric treatment on mentally disordered offenders in Sweden. *Int J Law Psychiatry*. 14:237-43.
- Benderdour, M., G. Charron, D. DeBlois, B. Comte, and C. Des Rosiers. 2003. Cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation: an event that precedes hypertrophy development. *J Biol Chem*. 278:45154-9.
- Bengtsson, T., A. Aszodi, C. Nicolae, E.B. Hunziker, E. Lundgren-Akerlund, and R. Fassler. 2005. Loss of alpha10beta1 integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes. *J Cell Sci*. 118:929-36.
- Bennaars-Eiden, A., L. Higgins, A.V. Hertzler, R.J. Kappahn, D.A. Ferrington, and D.A. Bernlohr. 2002. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem*. 277:50693-702.
- Beretta, G., R. Artali, L. Regazzoni, M. Panigati, and R.M. Facino. 2007. Glycyl-histidyl-lysine (GHK) is a quencher of alpha,beta-4-hydroxy-trans-2-nonenal: a comparison with carnosine. insights into the mechanism of reaction by electrospray ionization mass spectrometry, 1H NMR, and computational techniques. *Chem Res Toxicol*. 20:1309-14.
- Bertolini, D.R., G.E. Nedwin, T.S. Bringman, D.D. Smith, and G.R. Mundy. 1986. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*. 319:516-8.

- Bingham, C.O., 3rd, and K.F. Austen. 1999. Phospholipase A2 enzymes in eicosanoid generation. *Proc Assoc Am Physicians*. 111:516-24.
- Birkedal-Hansen, H., W.G. Moore, M.K. Bodden, L.J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, and J.A. Engler. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 4:197-250.
- Blaney Davidson, E.N., P.M. van der Kraan, and W.B. van den Berg. 2007. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 15:597-604.
- Borkakoti, N. 2000. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med*. 78:261-8.
- Boyd, S.K., R. Muller, and R.F. Zernicke. 2002. Mechanical and architectural bone adaptation in early stage experimental osteoarthritis. *J Bone Miner Res*. 17:687-94.
- Brook, I.C., J. Cocker, and J. Groves. 1997. Phenylhydrazine Sudbury, Suffolk, HSE Books, Risk Assessment Document EH 72/1.
- Brownson, C., and A.R. Hipkiss. 2000. Carnosine reacts with a glycated protein. *Free Radic Biol Med*. 28:1564-70.
- Brune, B., S. Mohr, and U.K. Messmer. 1996. Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 127:1-30.
- Bulteau, A.L., K.C. Lundberg, K.M. Humphries, H.A. Sadek, P.A. Szweda, B. Friguet, and L.I. Szweda. 2001. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem*. 276:30057-63.
- Bunning, R.A., and R.G. Russell. 1989. The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the

production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 32:780-4.

Burr, D.B. 2004. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 12 Suppl A:S20-30.

Catala, A. 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:1482-95.

Catala, A. 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids.* 157:1-11.

Cawston, T.E., and A.J. Wilson. 2006. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 20:983-1002.

Chen, K.H., L.M. Reece, and J.F. Leary. 1999. Mitochondrial glutathione modulates TNF-alpha-induced endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 27:100-9.

Chiarotto, E., C. Domenicotti, D. Paola, A. Vitali, M. Nitti, M.A. Pronzato, F. Biasi, D. Cottalasso, U.M. Marinari, A. Dragonetti, P. Cesaro, C. Isidoro, and G. Poli. 1999. Regulation of rat hepatocyte protein kinase C beta isoenzymes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal: A signaling pathway to modulate vesicular transport of glycoproteins. *Hepatology.* 29:1565-72.

- Chow, G., C.B. Knudson, G. Homandberg, and W. Knudson. 1995. Increased expression of CD44 in bovine articular chondrocytes by catabolic cellular mediators. *J Biol Chem.* 270:27734-41.
- Clancy, R.M., J. Rediske, X. Tang, N. Nijher, S. Frenkel, M. Philips, and S.B. Abramson. 1997. Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A/focal adhesion kinase signaling complex. *J Clin Invest.* 100:1789-96.
- Clark, E.A., and J.S. Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 268:233-9.
- Clark, J.M. 1991. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit, and man. *J Orthop Res.* 9:246-57.
- Cys, J. 2003. Bedding down costs. *Mater Manag Health Care.* 12:20-2.
- Dalle-Donne, I., D. Giustarini, R. Colombo, R. Rossi, and A. Milzani. 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 9:169-76.
- Damsky, C.H., and Z. Werb. 1992. Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol.* 4:772-81.
- Davies, K.J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem.* 262:9895-901.

- Davies, K.J., and M.E. Delsignore. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem.* 262:9908-13.
- Davies, K.J., and A.L. Goldberg. 1987. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem.* 262:8220-6.
- Davies, M.E., J.T. Dingle, R. Pigott, C. Power, and H. Sharma. 1991. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on human articular cartilage chondrocytes. *Connect Tissue Res.* 26:207-16.
- Davies, M.E., H. Sharma, and R. Pigott. 1992. ICAM-1 expression on chondrocytes in rheumatoid arthritis: induction by synovial cytokines. *Mediators Inflamm.* 1:71-4.
- Day, J.S., M. Ding, J.C. van der Linden, I. Hvid, D.R. Sumner, and H. Weinans. 2001. A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritic cartilage damage. *J Orthop Res.* 19:914-8.
- Day, J.S., J.C. Van Der Linden, R.A. Bank, M. Ding, I. Hvid, D.R. Sumner, and H. Weinans. 2004. Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology.* 41:359-68.
- Delaisse, J.a.V., G. 1992. in: *Biology and Physiology of the Osteoclast*, (Rifkin, B.R and Gay, C.V, Eds.), CRC Press, Boca Raton.:pp.289-314.
- Dianzani, M.U. 2003. 4-hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med.* 24:263-72.

- Doorn, J.A., and D.R. Petersen. 2003. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chem Biol Interact.* 143-144:93-100.
- Dubois, R.N., S.B. Abramson, L. Crofford, R.A. Gupta, L.S. Simon, L.B. Van De Putte, and P.E. Lipsky. 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12:1063-73.
- Dustin, M.L., R. Rothlein, A.K. Bhan, C.A. Dinarello, and T.A. Springer. 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 137:245-54.
- Eaton, P., J.M. Li, D.J. Hearse, and M.J. Shattock. 1999. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *Am J Physiol.* 276:H935-43.
- Egerbacher, M., and G. Haeusler. 2003. Integrins in growth plate cartilage. *Pediatr Endocrinol Rev.* 1:2-8.
- Escargueil-Blanc, I., R. Salvayre, N. Vacaresse, G. Jurgens, B. Darblade, J.F. Arnal, S. Parthasarathy, and A. Negre-Salvayre. 2001. Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway. *Circulation.* 104:1814-21.
- Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 11:81-128.
- Farahat, M.N., G. Yanni, R. Poston, and G.S. Panayi. 1993. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 52:870-5.

- Fernandes, J.C., J. Martel-Pelletier, and J.P. Pelletier. 2002. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 39:237-46.
- Fong, Y., D. Edelstein, E.A. Wang, and M. Brownlee. 1993. Inhibition of matrix-induced bone differentiation by advanced glycation end-products in rats. *Diabetologia*. 36:802-7.
- Forsyth, C.B., J. Pulai, and R.F. Loeser. 2002. Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 46:2368-76.
- Funk, C.D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 294:1871-5.
- Gardner, H.W., and N. Deighton. 2001. Effect of 4-hydroxy-2(E)-nonenal on soybean lipoxygenase-1. *Lipids*. 36:623-8.
- Goldring, M.B., J. Birkhead, L.J. Sandell, T. Kimura, and S.M. Krane. 1988. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest*. 82:2026-37.
- Goldring, S.R. 2008. The role of bone in osteoarthritis pathogenesis. *Rheum Dis Clin North Am*. 34:561-71.
- Greenwald, R.A., and W.W. Moy. 1980. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum*. 23:455-63.

- Gronowicz, G.A., and M.E. Derome. 1994. Synthetic peptide containing Arg-Gly-Asp inhibits bone formation and resorption in a mineralizing organ culture system of fetal rat parietal bones. *J Bone Miner Res.* 9:193-201.
- Grzesik, W.J., and P.G. Robey. 1994. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 9:487-96.
- Guccione, A.A., D.T. Felson, J.J. Anderson, J.M. Anthony, Y. Zhang, P.W. Wilson, M. Kelly-Hayes, P.A. Wolf, B.E. Kreger, and W.B. Kannel. 1994. The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am J Public Health.* 84:351-8.
- Guiotto, A., A. Calderan, P. Ruzza, and G. Borin. 2005. Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr Med Chem.* 12:2293-315.
- Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84:345-57.
- Haraoui, B., J.P. Pelletier, J.M. Cloutier, M.P. Faure, and J. Martel-Pelletier. 1991. Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In vivo effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum.* 34:153-63.
- Heimdal, J., K.P. Jensen, A. Devarajan, and U. Ryde. 2007. The role of axial ligands for the structure and function of chlorophylls. *J Biol Inorg Chem.* 12:49-61.
- Helmick, C.G., R.C. Lawrence, R.A. Pollard, E. Lloyd, and S.P. Heyse. 1995. Arthritis and other rheumatic conditions: who is affected now, who will be affected later? National Arthritis Data Workgroup. *Arthritis Care Res.* 8:203-11.

- Hipkiss, A.R. 2009. Chapter 3 carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv Food Nutr Res.* 57:87-154.
- Hipkiss, A.R., J.E. Preston, D.T. Himsworth, V.C. Worthington, and N.J. Abbot. 1997. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett.* 238:135-8.
- Hirai, F., S. Nakayamada, Y. Okada, K. Saito, H. Kurose, A. Mogami, and Y. Tanaka. 2007. Small GTPase Rho signaling is involved in beta1 integrin-mediated up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:279-85.
- Hirsch, M.S., L.E. Lunsford, V. Trinkaus-Randall, and K.K. Svoboda. 1997. Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev Dyn.* 210:249-63.
- Hodgson, J.M., R.K. Bottner, L.W. Klein, H.T. Walpole, Jr., D.J. Cohen, D.E. Cutlip, R.B. Fenninger, B.G. Firth, D. Greenberg, I. Kalisky, T. Meskan, W. Powell, G.W. Stone, J.P. Zito, and M.A. Clark. 2004. Drug-eluting stent task force: final report and recommendations of the working committees on cost-effectiveness/economics, access to care, and medicolegal issues. *Catheter Cardiovasc Interv.* 62:1-17.
- Horner, A., M.E. Davies, and B. Franz. 1995. Chondrocyte-peripheral blood mononuclear cell interactions: the role of ICAM-1. *Immunology.* 86:584-90.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-87.

- Ishida, O., Y. Tanaka, I. Morimoto, M. Takigawa, and S. Eto. 1997. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *J Bone Miner Res.* 12:1657-63.
- Knudson, W., D.J. Aguiar, Q. Hua, and C.B. Knudson. 1996. CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis. *Exp Cell Res.* 228:216-28.
- Knudson, W., B. Casey, Y. Nishida, W. Eger, K.E. Kuettner, and C.B. Knudson. 2000. Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum.* 43:1165-74.
- Knudson, W., and R.F. Loeser. 2002. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 59:36-44.
- Kume, S., S. Kato, S. Yamagishi, Y. Inagaki, S. Ueda, N. Arima, T. Okawa, M. Kojiro, and K. Nagata. 2005. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res.* 20:1647-58.
- Labrador, J.P., V. Azcoitia, J. Tuckermann, C. Lin, E. Olaso, S. Manes, K. Bruckner, J.L. Goergen, G. Lemke, G. Yancopoulos, P. Angel, C. Martinez, and R. Klein. 2001. The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Rep.* 2:446-52.
- Lapadula, G., F. Iannone, C. Zuccaro, V. Grattagliano, M. Covelli, V. Patella, G. Lo Bianco, and V. Pipitone. 1997. Integrin expression on chondrocytes: correlations

- with the degree of cartilage damage in human osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 15:247-54.
- Lawrence, R.C., C.G. Helmick, F.C. Arnett, R.A. Deyo, D.T. Felson, E.H. Giannini, S.P. Heyse, R. Hirsch, M.C. Hochberg, G.G. Hunder, M.H. Liang, S.R. Pillemer, V.D. Steen, and F. Wolfe. 1998. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum.* 41:778-99.
- Lefebvre, V., C. Peeters-Joris, and G. Vaes. 1990. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1052:366-78.
- Leitinger, B., and A.P. Kwan. 2006. The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix Biol.* 25:355-64.
- Leonarduzzi, G., M.C. Arkan, H. Basaga, E. Chiarotto, A. Sevanian, and G. Poli. 2000. Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 28:1370-8.
- Li, B., and R.M. Aspden. 1997. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis.* 56:247-54.
- Liu, Y., G. Xu, and L.M. Sayre. 2003. Carnosine inhibits (E)-4-hydroxy-2-nonenal-induced protein cross-linking: structural characterization of carnosine-HNE adducts. *Chem Res Toxicol.* 16:1589-97.
- Loeser, R.F. 2000. Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology.* 37:109-16.
- Loeser, R.F. 2002. Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology.* 39:119-24.

- Loeser, R.F., C.S. Carlson, and M.P. McGee. 1995. Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res.* 217:248-57.
- Loeser, R.F., S. Chubinskaya, C. Pacione, and H.J. Im. 2005a. Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 52:3910-7.
- Loeser, R.F., S. Sadiev, L. Tan, and M.B. Goldring. 2000. Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen. *Osteoarthritis Cartilage.* 8:96-105.
- Loeser, R.F., R.R. Yammani, C.S. Carlson, H. Chen, A. Cole, H.J. Im, L.S. Bursch, and S.D. Yan. 2005b. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52:2376-85.
- Mankin, H.J., H. Dorfman, L. Lippiello, and A. Zarins. 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 53:523-37.
- Mankin, H.J., and A.Z. Thrasher. 1975. Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 57:76-80.
- Mansell, J.P., J.F. Tarlton, and A.J. Bailey. 1997. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *Br J Rheumatol.* 36:16-9.

- Marlin, S.D., and T.A. Springer. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*. 51:813-9.
- Maroudas, A.I. 1976. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature*. 260:808-9.
- Martel-Pelletier, J., C. Boileau, J.P. Pelletier, and P.J. Roughley. 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 22:351-84.
- Martel-Pelletier, J., R. McCollum, J. DiBattista, M.P. Faure, J.A. Chin, S. Fournier, M. Sarfati, and J.P. Pelletier. 1992. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum*. 35:530-40.
- Masi, L., A. Franchi, M. Santucci, D. Danielli, L. Arganini, V. Giannone, L. Formigli, S. Benvenuti, A. Tanini, F. Beghe, and et al. 1992. Adhesion, growth, and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcif Tissue Int*. 51:202-12.
- McBride, D.J., Jr., J.R. Shapiro, and M.G. Dunn. 1998. Bone geometry and strength measurements in aging mice with the oim mutation. *Calcif Tissue Int*. 62:172-6.
- McCarthy, A.D., S.B. Etcheverry, L. Bruzzone, G. Lettieri, D.A. Barrio, and A.M. Cortizo. 2001. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol*. 2:16.
- Mengshol, J.A., M.P. Vincenti, C.I. Coon, A. Barchowsky, and C.E. Brinckerhoff. 2000. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear

- factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 43:801-11.
- Millward-Sadler, S.J., and D.M. Salter. 2004. Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng.* 32:435-46.
- Minekura, H., T. Kumagai, Y. Kawamoto, F. Nara, and K. Uchida. 2001. 4-Hydroxy-2-nonenal is a powerful endogenous inhibitor of endothelial response. *Biochem Biophys Res Commun.* 282:557-61.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:56-68.
- Miyata, T., O. Hori, J. Zhang, S.D. Yan, L. Ferran, Y. Iida, and A.M. Schmidt. 1996. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest.* 98:1088-94.
- Miyata, T., R. Inagi, Y. Iida, M. Sato, N. Yamada, O. Oda, K. Maeda, and H. Seo. 1994. Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Clin Invest.* 93:521-8.
- Monboisse, J.C., G. Poulin, P. Braquet, A. Randoux, C. Ferradini, and J.P. Borel. 1984. Effect of oxy radicals on several types of collagen. *Int J Tissue React.* 6:385-90.

- Morquette, B., Q. Shi, P. Lavigne, P. Ranger, J.C. Fernandes, and M. Bendoric. 2006. Production of lipid peroxidation products in osteoarthritic tissues: new evidence linking 4-hydroxynonenal to cartilage degradation. *Arthritis Rheum.* 54:271-81.
- Mow, V.C., A. Ratcliffe, and A.R. Poole. 1992. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials.* 13:67-97.
- Muir, H. 1983. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. *Biochem Soc Trans.* 11:613-22.
- Mukherjee, N., D.B. Saris, F.M. Schultz, L.J. Berglund, K.N. An, and O.D. SW. 2001. The enhancement of periosteal chondrogenesis in organ culture by dynamic fluid pressure. *J Orthop Res.* 19:524-30.
- Murphy, G., and F. Willenbrock. 1995. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol.* 248:496-510.
- Nah, S.S., I.Y. Choi, B. Yoo, Y.G. Kim, H.B. Moon, and C.K. Lee. 2007. Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF- α in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS Lett.* 581:1928-32.
- Nakayamada, S., Y. Okada, K. Saito, M. Tamura, and Y. Tanaka. 2003a. Beta1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *J Biol Chem.* 278:45368-74.
- Nakayamada, S., K. Saito, K. Fujii, M. Yasuda, M. Tamura, and Y. Tanaka. 2003b. beta1 integrin-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and Fas on

- rheumatoid synovial cells and Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum.* 48:1239-48.
- Negre-Salvayre, A., C. Coatrieux, C. Ingueneau, and R. Salvayre. 2008. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol.* 153:6-20.
- Neilson, M., A. White, U. Malik, E. Morrison, P.E. McGill, and S.W. McDonald. 2004. Changes in bone architecture in the femoral head and neck in osteoarthritis. *Clin Anat.* 17:378-91.
- Nelson, F., L. Dahlberg, S. Laverty, A. Reiner, I. Pidoux, M. Ionescu, G.L. Fraser, E. Brooks, M. Tanzer, L.C. Rosenberg, P. Dieppe, and A. Robin Poole. 1998. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest.* 102:2115-25.
- Netzel-Arnett, S., G.B. Fields, H. Birkedal-Hansen, and H.E. Van Wart. 1991. Sequence specificities of human fibroblast and neutrophil collagenases. *J Biol Chem.* 266:6747-55.
- Nigam, S., and T. Schewe. 2000. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1488:167-81.
- O'Driscoll, S.W., J.S. Fitzsimmons, and C.N. Comisso. 1997. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *J Orthop Res.* 15:682-7.
- Ornitz, D.M., and P.J. Marie. 2002. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 16:1446-65.

- Page, S., C. Fischer, B. Baumgartner, M. Haas, U. Kreusel, G. Loidl, M. Hayn, H.W. Ziegler-Heitbrock, D. Neumeier, and K. Brand. 1999. 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem.* 274:11611-8.
- Parola, M., G. Robino, F. Marra, M. Pinzani, G. Bellomo, G. Leonarduzzi, P. Chiarugi, S. Camandola, G. Poli, G. Waeg, P. Gentilini, and M.U. Dianzani. 1998. HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest.* 102:1942-50.
- Parsons, J.T., M.D. Schaller, J. Hildebrand, T.H. Leu, A. Richardson, and C. Otey. 1994. Focal adhesion kinase: structure and signalling. *J Cell Sci Suppl.* 18:109-13.
- Paul, R.G., and A.J. Bailey. 1999. The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interactions. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:653-60.
- Pedchenko, V.K., S.V. Chetyrkin, P. Chuang, A.J. Ham, M.A. Saleem, P.W. Mathieson, B.G. Hudson, and P.A. Voziyan. 2005. Mechanism of perturbation of integrin-mediated cell-matrix interactions by reactive carbonyl compounds and its implication for pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes.* 54:2952-60.
- Petersen, D.R., and J.A. Doorn. 2004. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med.* 37:937-45.
- Peyroux, J., and M. Sternberg. 2006. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris).* 54:405-19.
- Pitzke, P., J. Bujia, E. Wilmes, and C. Hammer. 1994. Expression of ICAM-1 on isolated human nasal, auricular and costal chondrocytes. *Acta Otolaryngol.* 114:81-6.

- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J.W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 275:21785-8.
- Poli, G., and R.J. Schaur. 2000. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life.* 50:315-21.
- Poole AR, K.T., Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. 2001. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res:Suppl:*S26-S33.
- Poulos, A. 1995. Very long chain fatty acids in higher animals--a review. *Lipids.* 30:1-14.
- Price, D.L., P.M. Rhatt, S.R. Thorpe, and J.W. Baynes. 2001. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J Biol Chem.* 276:48967-72.
- Provot, S., and E. Schipani. 2005. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun.* 328:658-65.
- Rathakrishnan, C., and M.L. Tiku. 1993. Lucigenin-dependent chemiluminescence in articular chondrocytes. *Free Radic Biol Med.* 15:143-9.
- Rees, M.D., E.C. Kennett, J.M. Whitelock, and M.J. Davies. 2008. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radic Biol Med.* 44:1973-2001.
- Reid, D.L., M.B. Aydelotte, and J. Mollenhauer. 2000. Cell attachment, collagen binding, and receptor analysis on bovine articular chondrocytes. *J Orthop Res.* 18:364-73.
- Rittie, L., J.C. Monboisse, M.C. Gorisse, and P. Gillery. 2002. Malondialdehyde binding to proteins dramatically alters fibroblast functions. *J Cell Physiol.* 191:227-36.

- Robinson, D.R., A.H. Tashjian, Jr., and L. Levine. 1975. Prostaglandin-stimulated bone resorption by rheumatoid synovia. A possible mechanism for bone destruction in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 56:1181-8.
- Ronziere, M.C., E. Aubert-Foucher, J. Gouttenoire, J. Bernaud, D. Herbage, and F. Mallein-Gerin. 2005. Integrin alpha1beta1 mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1746:55-64.
- Rothlein, R., M.L. Dustin, S.D. Marlin, and T.A. Springer. 1986. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol.* 137:1270-4.
- Ruef, J., G.N. Rao, F. Li, C. Bode, C. Patterson, A. Bhatnagar, and M.S. Runge. 1998. Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Circulation.* 97:1071-8.
- Ruoslahti, E. 1991. Integrins. *J Clin Invest.* 87:1-5.
- Ruoslahti, E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:697-715.
- Sadouk, M.B., J.P. Pelletier, G. Tardif, K. Kiansa, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier. 1995. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Lab Invest.* 73:347-55.
- Sakata, N., Y. Sasatomi, J. Meng, S. Ando, N. Uesugi, S. Takebayashi, R. Nagai, and S. Horiuchi. 2000. Possible involvement of altered RGD sequence in reduced adhesive and spreading activities of advanced glycation end product-modified fibronectin to vascular smooth muscle cells. *Connect Tissue Res.* 41:213-28.

- Schaur, R.J. 2003. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 24:149-59.
- Setton, L.A., D.M. Elliott, and V.C. Mow. 1999. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 7:2-14.
- Seyedin, S.M., and D.M. Rosen. 1990. Matrix proteins of the skeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 2:914-9.
- Shah, R., K. Raska, Jr., and M.L. Tiku. 2005. The presence of molecular markers of in vivo lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52:2799-807.
- Shakibaei, M., T. John, P. De Souza, R. Rahmanzadeh, and H.J. Merker. 1999. Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J.* 342 Pt 3:615-23.
- Shi, Q., F. Vaillancourt, V. Cote, H. Fahmi, P. Lavigne, H. Afif, J.A. Di Battista, J.C. Fernandes, and M. Benderdour. 2006. Alterations of metabolic activity in human osteoarthritic osteoblasts by lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal. *Arthritis Res Ther.* 8:R159.
- Shirasawa, S., I. Sekiya, Y. Sakaguchi, K. Yagishita, S. Ichinose, and T. Muneta. 2006. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem.* 97:84-97.

- Shrivastava, A., C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T.E. Ryan, S. Davis, M.P. Goldfarb, D.J. Glass, G. Lemke, and G.D. Yancopoulos. 1997. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell*. 1:25-34.
- Siems, W., and T. Grune. 2003. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med*. 24:167-75.
- Sies, H., and E. Cadenas. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 311:617-31.
- Slatter, D.A., R.G. Paul, M. Murray, and A.J. Bailey. 1999. Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen. *J Biol Chem*. 274:19661-9.
- Smith, W.L. 1989. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J*. 259:315-24.
- Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 69:145-82.
- Sofat, N. 2009. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *Int J Exp Pathol*. 90:463-79.
- Stocker, W., F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F.X. Gomis-Ruth, D.B. McKay, and W. Bode. 1995. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci*. 4:823-40.

- Stupack, D.G., X.S. Puente, S. Boutsaboualoy, C.M. Storgard, and D.A. Cheresch. 2001. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol.* 155:459-70.
- Sun, S., K. Meyer-Arendt, B. Eichelberger, R. Brown, C.Y. Yen, W.M. Old, K. Pierce, K.J. Cios, N.G. Ahn, and K.A. Resing. 2007. Improved validation of peptide MS/MS assignments using spectral intensity prediction. *Mol Cell Proteomics.* 6:1-17.
- Takahashi, K., N. Avissar, J. Whitin, and H. Cohen. 1987. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 256:677-86.
- Takaishi, H., T. Kimura, S. Dalal, Y. Okada, and J. D'Armiento. 2008. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. *Curr Pharm Biotechnol.* 9:47-54.
- Teitelbaum, S.L. 2007. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 170:427-35.
- Teitelbaum, S.L., and F.P. Ross. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 4:638-49.
- Tiku, M.L., G.T. Allison, K. Naik, and S.K. Karry. 2003. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 11:159-66.
- Tiku, M.L., J.B. Liesch, and F.M. Robertson. 1990. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *J Immunol.* 145:690-6.
- Tiku, M.L., H. Narla, M. Jain, and P. Yalamanchili. 2007. Glucosamine prevents in vitro collagen degradation in chondrocytes by inhibiting advanced lipoxidation reactions and protein oxidation. *Arthritis Res Ther.* 9:R76.

- Tiku, M.L., R. Shah, and G.T. Allison. 2000. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem.* 275:20069-76.
- Uchida, K. 1999. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med.* 9:109-13.
- Uchida, K. 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 42:318-43.
- Uchida, K., M. Kanematsu, K. Sakai, T. Matsuda, N. Hattori, Y. Mizuno, D. Suzuki, T. Miyata, N. Noguchi, E. Niki, and T. Osawa. 1998. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4882-7.
- Uchida, K., M. Shiraishi, Y. Naito, Y. Torii, Y. Nakamura, and T. Osawa. 1999. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem.* 274:2234-42.
- Ullrich, O., H. Huser, W. Ehrlich, and T. Grune. 1997. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 22:1153-7.
- Vaillancourt, F., H. Fahmi, Q. Shi, P. Lavigne, P. Ranger, J.C. Fernandes, and M. Benderdour. 2008. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase. *Arthritis Res Ther.* 10:R107.

- Vaillancourt, F., B. Morquette, Q. Shi, H. Fahmi, P. Lavigne, J.A. Di Battista, J.C. Fernandes, and M. Benderdour. 2007. Differential regulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes through ATF-2/CREB-1 transactivation and concomitant inhibition of NF-kappaB signaling cascade. *J Cell Biochem.* 100:1217-31.
- van der Kraan, P.M., P. Buma, T. van Kuppevelt, and W.B. van den Berg. 2002. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage.* 10:631-7.
- van der Kraan, P.M., and W.B. van den Berg. 2007. Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage.* 15:237-44.
- Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:97-120.
- Venn, M.F. 1979. Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation. *Ann Rheum Dis.* 38:57-62.
- Viji, R.I., V.B. Kumar, M.S. Kiran, and P.R. Sudhakaran. 2008. Modulation of cyclooxygenase in endothelial cells by fibronectin: relevance to angiogenesis. *J Cell Biochem.* 105:158-66.
- Vilardo, P.G., A. Scaloni, P. Amodeo, C. Barsotti, I. Cecconi, M. Cappiello, B. Lopez Mendez, R. Rullo, M. Dal Monte, A. Del Corso, and U. Mura. 2001. Thiol/disulfide interconversion in bovine lens aldose reductase induced by intermediates of glutathione turnover. *Biochemistry.* 40:11985-94.

- von der Mark K. 1986. Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. *Rheumatology*. 10:272-315.
- von der Mark, K., V. Gaus, H. von der Mark, and P. Muller. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. 267:531-2.
- Voss, P., and W. Siems. 2006. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic Res*. 40:1339-49.
- Waeg, G., G. Dimsity, and H. Esterbauer. 1996. Monoclonal antibodies for detection of 4-hydroxynonenal modified proteins. *Free Radic Res*. 25:149-59.
- Wei, L., X.J. Sun, Z. Wang, and Q. Chen. 2006. CD95-induced osteoarthritic chondrocyte apoptosis and necrosis: dependency on p38 mitogen-activated protein kinase. *Arthritis Res Ther*. 8:R37.
- Westacott, C.I., and M. Sharif. 1996. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum*. 25:254-72.
- Woods, V.L., Jr., P.J. Schreck, D.S. Gesink, H.O. Pacheco, D. Amiel, W.H. Akeson, and M. Lotz. 1994. Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 37:537-44.
- Xu, L., H. Peng, D. Wu, K. Hu, M.B. Goldring, B.R. Olsen, and Y. Li. 2005. Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice. *J Biol Chem*. 280:548-55.
- Yammani, R.R., C.S. Carlson, A.R. Bresnick, and R.F. Loeser. 2006. Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to

stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis Rheum.* 54:2901-11.

Yeargans, G.S., and N.W. Seidler. 2003. Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 300:75-80.

Yong, K., and A. Khwaja. 1990. Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev.* 4:211-25.

Zemmyo, M., E.J. Meharra, K. Kuhn, L. Creighton-Achermann, and M. Lotz. 2003. Accelerated, aging-dependent development of osteoarthritis in alpha1 integrin-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 48:2873-80.

Zhou, S., and E.A. Decker. 1999. Ability of carnosine and other skeletal muscle components to quench unsaturated aldehydic lipid oxidation products. *J Agric Food Chem.* 47:51-5.