

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Étude des voies apoptotiques induites par le 4-hydroxynonéal dans les chondrocytes  
arthrosiques humains.

par

**France Vaillancourt**

Département de Pharmacologie  
Faculté de médecine.

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

Décembre, 2007

Copyright, France Vaillancourt, 2007.



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des voies apoptotiques induites par le 4-hydroxynonéal dans les chondrocytes  
arthrosiques humain.

Présenté par :

France Vaillancourt.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Rousseau

président-rapporteur

Mohamed Benderdour

directeur de recherche

Julio C. Fernandes

codirecteur

Hassan Fahmi

membre du jury

## RÉSUMÉ FRANÇAIS

**Objectif:** L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet du 4-hydroxynonéal (HNE), un produit de la peroxydation lipidique, sur les différentes voies apoptotiques dans les chondrocytes arthrosiques (OA) humains. **Méthodes:** Les marqueurs de l'apoptose ont été dosés par des troupes et par immunobuvardage de type Western dans des chondrocytes OA humains traités avec des concentrations croissantes de HNE. L'altération de l'état rédox dans les chondrocytes traités avec le HNE a été évaluée par la détermination du niveau de glutathion (GSH). Afin de déterminer le rôle de la glutathion-S-transférase (GST), la lignée SW1353 a été transfectée avec un vecteur d'expression de la GST-A4 puis traités avec le HNE. **Résultats:** Dans un premier volet nous avons observé que le HNE jusqu'à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  n'affecte pas la viabilité cellulaire. Toutefois, une diminution significative est obtenue lorsque les cellules ont été traitées avec 20 et 30  $\mu\text{M}$  de HNE. Dans un second volet, nous avons obtenu des résultats montrant que le HNE, à 20 et 30  $\mu\text{M}$ , induit la voie apoptotique intrinsèque par la libération du cytochrome *c* et l'activation de la caspase-9, et la voie apoptotique extrinsèque par l'activation de la caspase-8 et la caspase-3. De plus, nos résultats montrent une augmentation de la translocation de l'AIF dans le noyau et de la fragmentation de l'ADN pour ces mêmes concentrations. Par l'investigation de l'état rédox, nos résultats ont également montré que le HNE réduit le niveau intracellulaire du GSH et augmente celui de GSSG. Les effets du HNE décrit ci-dessus sont inhibés par un pré-traitement avec 200  $\mu\text{M}$  de N-acétylcystéine. Fait intéressant, la sur-expression de la GST-A4 sauvage protège les chondrocytes contre la cytotoxicité du HNE à 30  $\mu\text{M}$ . **Conclusion:** Les résultats de cette étude démontrent que le HNE induit l'apoptose des chondrocytes OA humains par l'activation de la voie apoptotique intrinsèque et

extrinsèque. En revanche, cette induction semble être prévenue par la sur-expression de la GST-A4 probablement via l'élimination rapide du HNE par cette enzyme. Ce projet a permis donc une meilleure compréhension du rôle que peut jouer le HNE dans l'arthrose et pourrait susciter de l'intérêt pour la recherche des nouveaux traitements qui pourront bloquer la production du HNE dans les tissus articulaires OA tels que la GST-A4 et les piègeurs de cette molécule.

**Mots clés :**

Arthrose, 4-hydroxynonéal, Apoptose, Chondrocytes, Peroxydation lipidique, Glutathion-S-transférase, antioxydant.

## SUMMARY

**Objective:** 4-Hydroxynonenal (HNE) is one of the most abundant and reactive aldehyde of lipid peroxidation products and it exerts various effects on intracellular and extracellular signalling cascades. We have previously shown that HNE could be considered as an important mediator in catabolic and inflammatory processes in osteoarthritis (OA). In this follow-up study, we focused on the characterization of signalling cascades during HNE-induced cell death in human OA chondrocytes.

**Methods:** Markers of apoptosis were determined by commercial kits and Western blotting in isolated OA chondrocytes incubated with increasing concentrations of HNE. The alteration of the redox status in OA chondrocytes treated with HNE was evaluated by glutathione (GSH) level determination. The protective role of glutathione-S-transferase (GST) was determined by SW1353 lineage transfection with an expression vector of GST-A4 followed by HNE treatment.

**Results:** Our data showed that HNE up to 10  $\mu\text{M}$  did not alter the cell viability but was cytotoxic at a concentration  $\geq 20 \mu\text{M}$ . HNE-induced chondrocyte death exhibited several classical hallmarks of apoptosis, including caspases activation, cytochrome *c* release from mitochondria, the anti-apoptotic factor Bcl-2 down-regulation, the pro-apoptotic factor Bax up-regulation and DNA fragmentation. The determination of the redox status revealed that HNE induced the depletion of the intracellular of GSH. Conversely, the overexpression of GST-A4 protein efficiently protected chondrocytes from HNE-induced cell death.

**Conclusion:** Our study provides a novel insight into the potential mechanisms of cell death in OA cartilage, and suggests the potential role of HNE in the pathophysiology of OA. The GST expression is critically important for cellular defence against oxidative stress-induced cell death possibly by HNE elimination.

**Key words :**

Osteoarthritis, 4-hydroxynonenal, Apoptosis, Chondrocytes, Lipid peroxydation, Glutathione-S-transferase, antioxidant.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	iii
SUMMARY.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiv
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
1.1. ANATOMIE DU GENOU.....	2
1.2. LE CARTILAGE ARTICULAIRE.....	3
1.2.1. Structure générale.....	3
- La matrice extracellulaire.....	6
- Collagène.....	7
- Protéoglycanes.....	8
- Les chondrocytes.....	8
1.3. L'ARTHROSE.....	10
1.3.1. La maladie.....	10
- Le cartilage.....	11
- L'os.....	15
- La Synoviale.....	16
1.3.2. Les cytokines.....	17
1.3.3. L'incidence.....	19
1.3.4. Les facteurs de risque.....	20
- L'âge.....	20
- Le genre.....	20
- La génétique.....	21
- Les facteurs hormonaux et la densité osseuse.....	22
- L'obésité.....	22
- Les sports.....	23
1.3.5. Les traitements.....	23
1.4. LA MORT CELLULAIRE.....	24
1.4.1. La nécrose.....	25
1.4.2. L'apoptose.....	25
1.4.3. Les mécanismes de l'apoptose.....	27
- Les caspases.....	29
- Les calpaines.....	30
1.4.4. La mitochondrie.....	31
- Le cytochrome <i>c</i> .....	32



- Smac/Diablo et HtrA2/Omi .....	32
- AIF et endo G.....	32
- La Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP-1).....	33
1.4.5. L'OA et l'apoptose .....	36
1.4.6. Les causes de l'apoptose dans les chondrocytes.....	37
1.5. LE NAC .....	38
1.6. LE STRESS OXYDATIF .....	39
- Les ROS .....	39
- La peroxydation lipidique .....	41
1.7. LE HNE .....	42
1.7.1. Les propriétés du HNE.....	42
1.7.2. Le métabolisme du HNE.....	44
1.7.3. Le HNE et L'OA.....	45
1.7.4. Le HNE et l'apoptose.....	46
OBJECTIF GÉNÉRAL.....	47
HYPOTHÈSES .....	48
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	49
2.1 Préparation des spécimens.....	50
2.2 Isolation des chondrocytes.....	50
2.3 Culture cellulaire .....	51
2.4 Test de viabilité.....	51
2.5 Dosage de l'activité de la caspase-3, -8 et -9.....	53
2.6 Dosage de Bcl-2.....	54
2.7 Mesure qualitative et quantitative de la fragmentation de l'ADN.....	55
2.8 Cytochrome <i>c</i> .....	57
2.9 Immunobuvardage de type Western .....	58
2.10 Dosage du GSH.....	60
2.11 Transfection des chondrocytes avec GST-A4.....	61
2.12 Analyses statistiques .....	62
CHAPITRE III : RÉSULTATS .....	63
3.1 Effet du HNE sur la viabilité des chondrocytes OA.....	64
3.2 Dosage de l'activité enzymatique et du niveau protéique de la caspase-8 .....	66
3.3 Effet du HNE sur le récepteur Fas .....	68
3.4 Bax/Bcl-2 .....	70
3.5 Dosage du cytochrome <i>c</i> .....	72
3.6 Dosage de l'activité enzymatique et de niveau protéique de la caspase-9 .....	74
3.7 Dosage de l'activité enzymatique et de niveau protéique de la caspase-3 .....	76
3.8 Effet de HNE sur l'activation de PARP .....	78
3.9 Dosage protéique de l'AIF dans les noyaux .....	80
3.10 Fragmentation de l'ADN .....	80
3.11 Détermination de l'état redox intracellulaire .....	83
3.12 Le rôle de la GST-A4 dans la protection contre la cytotoxicité du HNE .....	85
CHAPITRE IV : DISCUSSION .....	87

CONCLUSION ..... 101

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Schéma représentant la structure générale du cartilage articulaire d'un adulte.....	4
<b>Figure 2</b> : Différence entre un genou normal et un genou OA. ....	12
<b>Figure 3</b> : Représentation des voies conduisant à la mort cellulaire soit par nécrose ou par apoptose. ....	26
<b>Figure 4</b> : Représentation de la voie apoptotique caspase-dépendante et caspase-indépendante. ....	28
<b>Figure 5</b> : Mécanismes possibles conduisant à la libération de l'AIF par la mitochondrie. ....	34
<b>Figure 6</b> : Implication de la PARP dans le processus apoptotique. ....	35
<b>Figure 7</b> : Structure de la molécule du HNE montrant la double liaison $\alpha$ et $\beta$ .....	43
<b>Figure 8</b> : Effet du HNE sur la viabilité des chondrocytes humains OA et en présence du NAC comme agent protecteur. ....	65
<b>Figure 9</b> : Effet du HNE sur l'activité enzymatique et sur le niveau protéique de la caspase-8. ....	67
<b>Figure 10</b> : Implication du récepteur Fas dans l'induction de l'apoptose par le HNE. ....	69
<b>Figure 11</b> : Effet du HNE sur le niveau d'expression protéique de Bax et Bcl-2.....	71
<b>Figure 12</b> : Capacité du HNE à induire la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol.....	73
<b>Figure 13</b> : Effet du HNE sur le niveau d'activité et protéique de la caspase-9. ....	75
<b>Figure 14</b> : Effet du HNE sur l'activité et sur le niveau protéique de la caspase-3.....	77
<b>Figure 15</b> : Rôle de l'activation du PARP sur la viabilité cellulaire des chondrocytes humain OA stimulés avec le HNE.....	79
<b>Figure 16</b> : Effet du HNE sur la translocation de l'AIF dans les noyaux.....	81
<b>Figure 17</b> : L'étude de la fragmentation de l'ADN dans les chondrocytes humains OA induite par le HNE.....	82
<b>Figure 18</b> : Effet de HNE sur l'état redox dans les chondrocytes humains OA .....	84

<b>Figure 19 : Effet de la GST-A4 dans la protection contre la cytotoxicité du</b>	
<b>HNE. ....</b>	<b>86</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor</i>
COLL II	Collagène type II
COX	Cyclooxygénase
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DTNB	Acide 5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoic
EndoG	Endonucléase G
FBS	Sérum bovin fœtal
GPx	Glutation peroxydase
Gred	Glutathion reductase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutation-S-transférase
HNE	4-hydroxynonéal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose
IGF	Facteur de croissance à l'insuline
IL-1R	Récepteur de l'IL-1
IL-1Ra	Antagoniste naturel du récepteur de l'IL-1
IL-1β	Interleukine 1 bêta
INH <sub>2</sub> BP	5-iodo-6-amino-1,2-benzopyrone
iNOS	Oxide nitrique synthase inductible
JNK	c-Jun N-terminal protéine kinase
MMP	Métalloprotéinase
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NAC	N-acétylcystéine
NO	Oxyde nitrique

OA	Arthrose
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PBS	Tampon phosphate salin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
RA	Arthrite rhumatoïde
ROS	Radicaux libre d'oxygène
SOD	Superoxyde dismutase
TGF	Facteur de croissance transformant
TIMP-1	inhibiteur tissulaire de la MMP-1
TNB	Acide 5-thio-2-nitrobenzoic
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose de tumeur alfa
Z-DEVD-FMK	Benzyloxycarboxyl-Asp-Glu-Val-Asp-CH <sub>2</sub> F
Z-LEHD-FMK	Z-Leu-Glu-His-Asp-CH <sub>2</sub> F

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche Mohamed Benderdour pour son encadrement et sa grande disponibilité. Il m'a permis de m'épanouir dans mon travail en développant mon esprit d'analyse.

De plus, je voudrais remercier mon co-directeur Julio Fernandes ainsi que la formidable équipe de recherche avec qui j'ai partagé de merveilleux moments. Merci à Véronique, Qui Shi et Hui -ji qui sont des collègues de travail exceptionnels et qui ont rempli de rire et de joie mes journées.

# **CHAPITRE I: INTRODUCTION**



## 1.1. ANATOMIE DU GENOU

Pour acquérir les notions importantes menant à la bonne compréhension de la pathophysiologie de l'OA voici une brève description du genou avec ses différentes composantes.

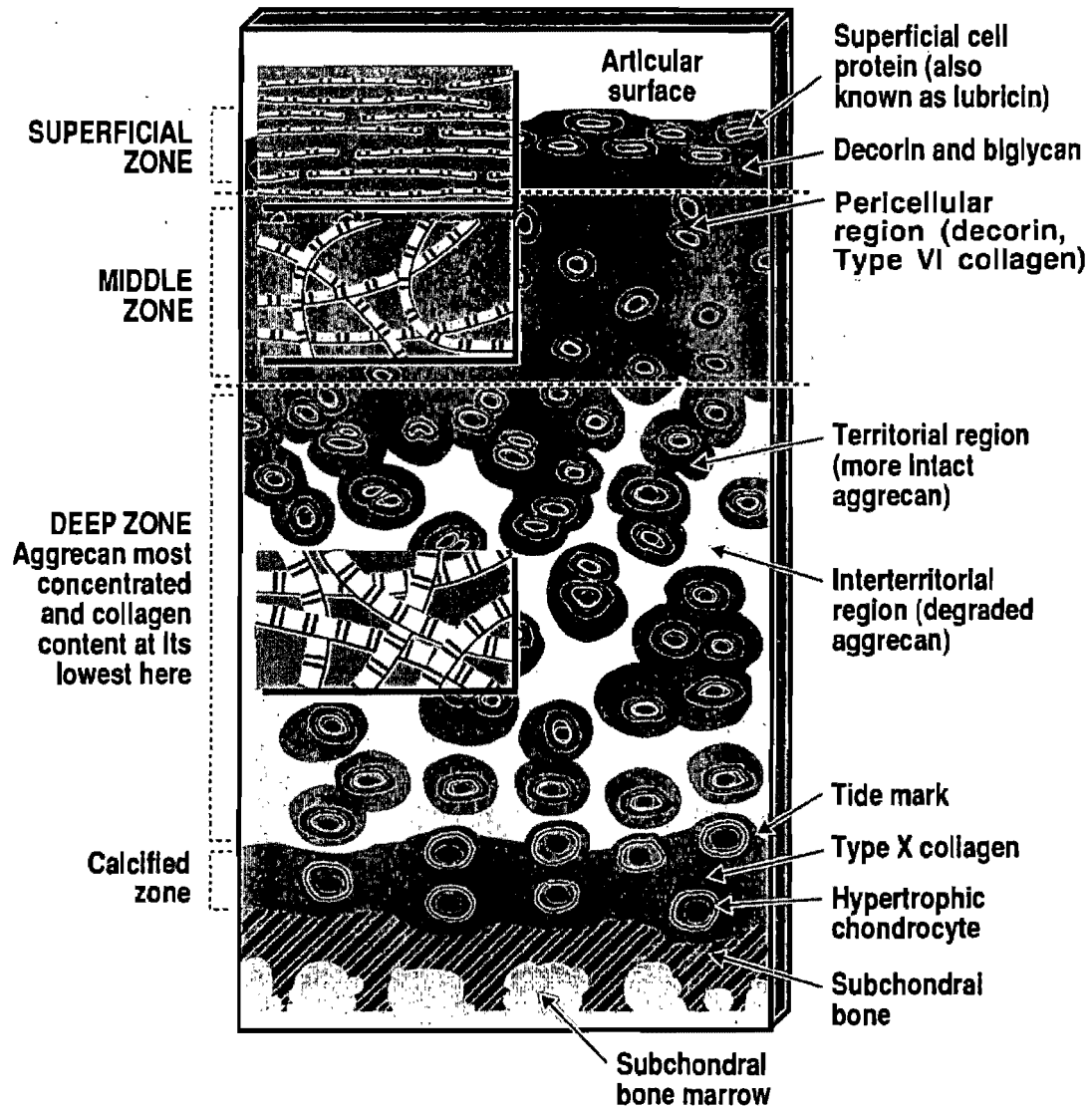
Le genou est une articulation complexe qui doit être mobile et souple pour permettre le mouvement. En contre partie il doit supporter le poids de la personne et résister aux forces appliquées. Le genou peut être divisé en plusieurs composantes (les os, les ligaments, les muscles, le cartilage et la membrane synoviale) qui ont chacune une fonction indispensable à l'articulation. Tout d'abord, quatre segments osseux composent le genou et forment une structure stable. Plus précisément, il est composé de la partie inférieure du fémur, de la rotule, de la partie supérieure du tibia et de la tête du péroné. Cette structure est maintenue à l'aide de 13 ligaments qui assurent le contact entre les os. Les principaux ligaments sont le ligament latéral interne, le ligament latéral externe, le ligament croisé postérieur et le ligament croisé antérieur. En plus des composantes précédentes, les muscles reliés aux os par les tendons sont indispensable au mouvement de la jambe. Un autre constituant important de l'articulation est le cartilage qui est dépourvu de vaisseaux sanguins ou lymphatiques, permet une friction minimale et réduit les impacts. Dans le genou, le cartilage est situé à l'extrémité du fémur et du tibia ainsi qu'à la partie postérieure de la rotule. La dernière composante du genou est la membrane synoviale. Les cellules de cette membrane produisent le liquide synovial qui est une substance claire et visqueuse. Le liquide synovial agit comme une barrière protectrice en

assurant la fonction de lubrification des surfaces articulaires opposées et prévient leurs contacts. De plus, il apporte les nutriments aux cellules du cartilage tout en éliminant leurs sécrétions. Dans les prochains paragraphes, la structure détaillée du cartilage articulaire sera dépeinte.

## **1.2. LE CARTILAGE ARTICULAIRE**

### **1.2.1. Structure générale**

Le cartilage articulaire recouvrant les os du genou est de type hyalin. Il a une structure et une organisation qui relèvent d'une architecture simple. Ce tissu est composé d'un seul type cellulaire hautement spécifique, les chondrocytes. Ces cellules occupent un volume minoritaire du cartilage (2-3%) et sont entourées d'une matrice extracellulaire dense composée principalement de fibres de collagènes et de protéoglycanes. Le rôle de ces différentes composantes sera étudié plus en profondeur ultérieurement, mais avant, les différentes zones composant le cartilage illustrées à la figure 1 seront caractérisées. Pour chacune de ces zones, la proportion, la forme et l'orientation des principales composantes (chondrocytes, fibres de collagènes et protéoglycanes) varient selon ses fonctions et ses spécialisations. En ordre d'apparition, la zone tangentielle se compose de fibres de collagène denses orientées parallèlement à la surface articulaire, de chondrocytes ayant une forme ovale et aplatie, d'un pourcentage élevé de collagène, de protéoglycanes et d'un faible pourcentage d'aggrécans (Venn, 1978). Cette zone est celle qui participe le plus dans la résistance à la force de pression, de compression, de cisaillement et de pression (Kempson et al., 1973; Akizuki et al., 1986).



**Figure 1 :** Schéma représentant la structure générale du cartilage articulaire d'un adulte. Représentation des différentes zones, régions et de l'organisation des fibres de collagène et des chondrocytes dans ces différentes zones (Poole et al., 2001).

La zone transitionnelle (couche moyenne) se situe en-dessous de la zone précédente. Les chondrocytes retrouvés dans cette zone ont une forme arrondie tout en étant distribués aléatoirement. La densité cellulaire y est toutefois plus faible que dans la zone précédente. La matrice extracellulaire composant cette zone est riche en protéoglycanes principalement de type aggrécane et les fibres de collagène qui y sont retrouvées sont orientées de façon oblique tout en étant moins organisées que celles retrouvées dans la zone précédente.

La zone radiaire (couche profonde), située entre la zone transitionnelle et la zone calcifiée, est la plus volumineuse. La concentration en aggrécanes et le diamètre des fibres de collagènes y sont à leur maximum alors que la densité en cellules y est à son plus faible (Venn, 1978). Les chondrocytes présents dans cette zone sont plus gros que dans les autres couches et présentent une forme arrondie. Les chondrocytes retrouvés dans cette zone ainsi que dans la zone transitionnelle sont les plus actifs métaboliquement, ils ont la capacité de synthétiser et de dégrader toutes les composantes de la matrice extracellulaire.

La dernière couche, la zone calcifiée, est un cartilage calcifié. Cette couche sépare le cartilage articulaire de l'os sous-chondral. Le peu de chondrocytes présents dans cette zone présentent un phénotype hypertrophié. La capacité de ces chondrocytes à synthétiser le collagène de type X et à calcifier la matrice extracellulaire les rendent uniques. La

transition entre les différentes zones du cartilage se fait graduellement, excepté entre la zone radiale et la zone calcifiée qui sont séparées par le Tide mark.

### - La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire entourant les chondrocytes se compose principalement d'eau (65-70% de son poids total), de protéoglycanes (15-30% du poids sec) et de fibres de collagène (66% du poids sec) (Maroudas et al., 1969; Venn and Maroudas, 1977; Eyre, 2004). Ces composantes sont à l'origine des principales propriétés du cartilage, soit la résistance aux forces de compression, de gonflement et de traction (Kuettner and Cole, 2005). Plus précisément, les protéoglycanes, par leur nature hydrophilique, attirent une grande quantité d'eau dans les espaces intramoléculaires et intermoléculaires. Il en découle une résistance aux forces de compression. En contre partie, les protéoglycanes exercent une force de gonflement à l'intérieur du cartilage. Les fibres de collagène permettent de résister à cette force tout en procurant à la matrice la résistance aux forces de traction. Ces composantes seront décrites plus en profondeur après avoir décrit les différentes zones qui composent la matrice extracellulaire et les joueurs impliqués dans sa régulation.

Tout comme le cartilage, la matrice peut être divisée en trois zones dont la composition varie. Tout d'abord, entourant les chondrocytes et faisant 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, la zone péri-cellulaire est riche en collagène de type VI, en protéoglycanes décorin et en aggrecanes. Toutefois, les fibres de collagène y sont peu présentes (Poole et al., 1980; Poole et al., 1986; Keene et al., 1988). Adjacente à la zone précédente, il y a la zone

territoriale qui est composée principalement de collagène de type II. La troisième zone, la matrice interstitielle, n'est présente que dans la zone radiaire, elle se distingue des deux autres zones au niveau de l'ultrastructure des agrécans et des protéoglycans (Poole et al., 1982).

La régulation de la matrice extracellulaire est assurée en partie par les chondrocytes comme décrit ultérieurement, mais aussi par les cellules de l'os via la production de cytokines telles que l'interleukine-1 bêta (IL-1 $\beta$ ) et l'IL-6 et des eicosanoïdes telles que la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et les leucotriènes B<sub>4</sub>. La production de cytokines pro-inflammatoires par le cartilage et l'os favorise la synthèse de métalloprotéinases (MMPs) qui jouent un rôle important dans la dégradation de la matrice. En effet, les MMPs ont l'habilité de cliver les composantes de la matrice extracellulaire ainsi que d'autres protéinases, des inhibiteurs de protéinases, des récepteurs de surface, des facteurs de croissance latent, des molécules chimiotactiques et des molécules d'adhésion cellule-cellule (Sternlicht and Werb, 2001). La grande variété de substrats des MMPs leur permet d'influencer plusieurs processus physiologiques et pathologiques (Sternlicht and Werb, 2001).

### - Collagène

Dans le cartilage hyalin, les fibres de collagène ont un diamètre variable dépendamment de la zone du cartilage où elles se trouvent. Par exemple, dans la zone superficielle, les fibres de collagène ont un diamètre de 20 nm alors que dans la zone radiaire le diamètre des fibres se situe entre 70 et 120 nm. Elles sont formées de deux

types de collagène, le collagène de type II qui représente 90% de la fibre de collagène et le collagène de type IX qui représente 2% du collagène total. Le collagène de type II est l'un des composés les plus abondants dans le cartilage, il représente 60% du poids sec de ce tissu (Dudhia, 2005).

Dans le cartilage, les fibres de collagène sont dégradées par des collagénases, soit la collagénase-1 (MMP-1), la collagénase-2 (MMP-8) et la collagénase-3 (MMP-13) qui clivent les molécules de collagène (type I, II, III) en deux fragments (  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{4}$  ) (Eyre, 2004). Dans le cartilage, où le collagène de type II est dominant, la MMP-13 est la collagénase la plus impliquée (Reboul et al., 1996;Stremme et al., 2003).

#### **- Protéoglycanes**

Les protéoglycanes jouent deux rôles importants dans le cartilage attribuable aux nombreuses charges négatives. En premier lieu, ils permettent d'avoir une teneur très élevée en eau, et en deuxième lieu, ils permettent le transport des nutriments (Dudhia, 2005). Dans le cartilage hyalin, les agrécans sont les principales protéoglycanes. Elles représentent 35 % du poids sec des protéines retrouvées dans le cartilage (Dudhia, 2005). Les agrécans s'associent avec les hyaluronans et de petites glycoprotéines pour former des agrégats pouvant atteindre un poids moléculaire de  $10^8$ - $10^9$  Da (Dudhia, 2005).

#### **- Les chondrocytes**

Dans le cartilage articulaire, les chondrocytes jouent un rôle indispensable en étant très actifs métaboliquement, alors que leur potentiel de division est peu élevé et décroît

avec l'âge. Généralement, à l'âge adulte, les chondrocytes ne se divisent plus. Les chondrocytes ont comme rôle, dans le cartilage articulaire, d'assurer l'homéostasie par la synthèse et le maintien de la matrice extracellulaire via la production locale de facteurs de croissances et la synthèse des constituants de la matrice comme les protéoglycanes et le collagène. Au moins deux programmes distincts peuvent être répertoriés dans les chondrocytes du cartilage mature. Le programme catabolique, induit par des stimuli pro-inflammatoires, est caractérisé par la sécrétion de protéases, la suppression de la synthèse de la matrice et l'inhibition de la prolifération des chondrocytes. À l'inverse, le programme anabolique, est associé à la synthèse de cytokines antagonistes, à la sécrétion des inhibiteurs de protéases, à la synthèse de matrice extracellulaire et à la prolifération cellulaire. Ces deux processus sont contrôlés par une variété de messagers extracellulaires incluant les facteurs de croissance tels que le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ), le facteur de croissance à l'insuline-1 (IGF-I), les cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$  et le facteur de nécrose de tumeur alpha (TNF- $\alpha$ ) (Lotz et al., 1995). Le déséquilibre du programme catabolique et anabolique peut conduire à la dégradation du cartilage et semble être impliqué dans une maladie qui affecte les articulations, l'arthrose. Cette maladie sera abordée dans la prochaine section.



## 1.3. L'ARTHROSE

### 1.3.1. La maladie

Plusieurs maladies arthritiques peuvent affecter les articulations. Parmi celle-ci, l'OA est la plus répandue. Elle affecte généralement les personnes d'âge moyen à âgées et devient le problème de santé le plus fréquent et le plus symptomatique (Simon, 1999; Leigh et al., 2001; Brooks, 2002; Reginster, 2002). Cette maladie dégénérative qui présente une inflammation secondaire est caractérisée par une dysfonction de l'articulation ainsi que des douleurs articulaires. Au début de la maladie, les symptômes observés sont dus à la dégénération de l'articulation incluant une perte progressive du cartilage, la formation d'ostéophyte ainsi qu'un remodelage et une sclérose de l'os sous-chondral. Les patients en stade avancé de la maladie présentent des contractures de l'articulation, une atrophie musculaire ainsi qu'une difformité au niveau des membres affectés (Buckwalter and Martin, 1995; Buckwalter et al., 2000).

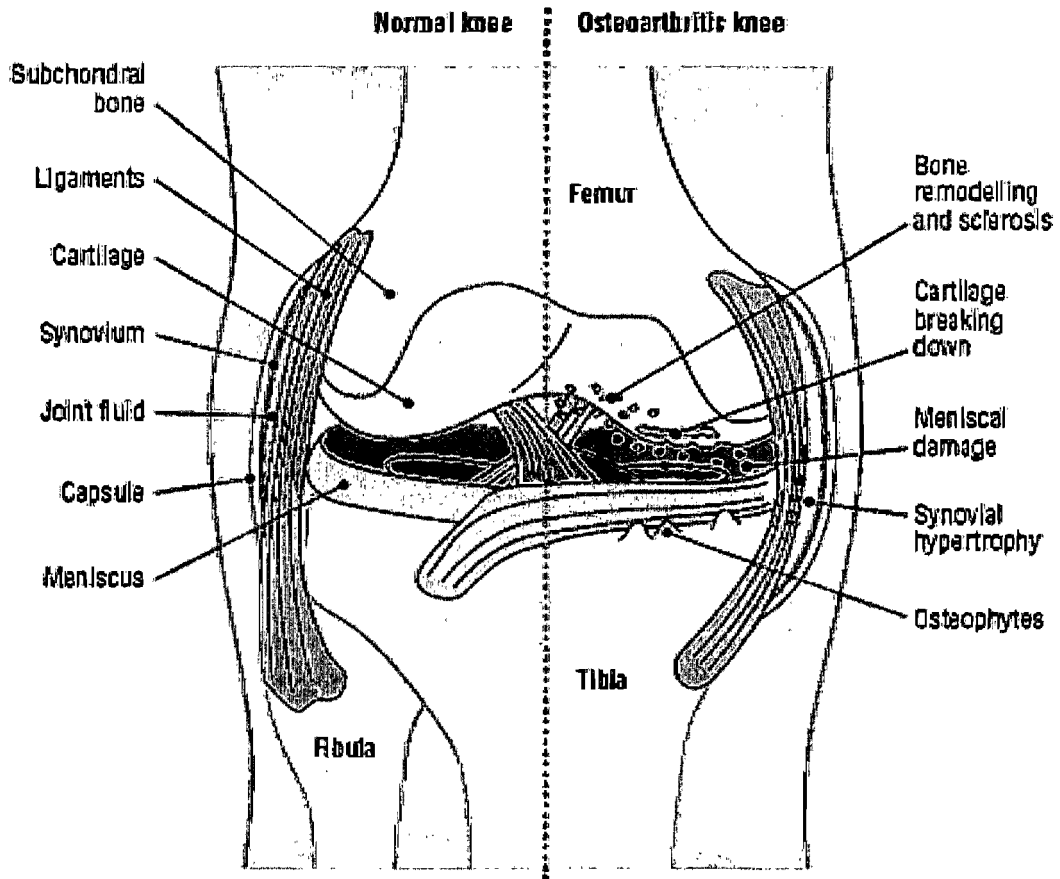
La progression de cette maladie peut être divisée en trois phases (Martel-Pelletier, 2004). La première phase consiste en une dégradation protéolytique de la matrice du cartilage. Durant la deuxième phase, il y a de la fibrillation soit un remplacement du collagène de type II en collagène de type I et de l'érosion à la surface du cartilage pouvant être accompagnées d'une diminution de la sécrétion des produits dans le liquide synovial. Finalement, au stade trois de la maladie, la réponse inflammatoire fait son apparition suite à la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à une diminution de l'activité phagocytaire des synoviocytes (Martel-Pelletier, 2004). La

progression de cette maladie affecte la structure entière de l'articulaire comme indiquée à la figure 2. Elle affecte le cartilage articulaire, l'os sous-chondral, les ligaments, la capsule, la membrane synoviale et les muscles périarticulaires (Fernandes et al., 2002). Son impact sur chacune des différentes structures sera abordé dans les prochains paragraphes.

### - **Le cartilage**

Lors du développement de l'OA, le cartilage subit plusieurs modifications. Des études ont observé la présence de lacunes vides et une dégradation de la matrice extracellulaire autour des chondrocytes situés dans la zone superficielle. De surcroît, une augmentation de la division cellulaire qui est nulle dans le cartilage normal est souvent noté (Stockwell, 1971).

Lors de l'évolution de l'OA, la matrice extracellulaire ainsi que ses composantes peuvent être altérées. En effet, la qualité du cartilage change suite à un déséquilibre des mécanismes d'homéostasie. En effet, dans la plupart des sites où le cartilage est affecté par l'OA, le processus anabolique est déficient comparativement au processus catabolique. Ce déséquilibre peut être causé par la différenciation des chondrocytes. Par exemple, il y a une augmentation de la synthèse de protéinases et une diminution de l'effet anabolique des facteurs de croissance. Dans un second volet, les changements observés peuvent résulter de l'augmentation de l'apoptose des chondrocytes qui a comme conséquence de réduire la capacité de restaurer les lésions dans le cartilage.



**Figure 2 :** Différence entre un genou normal et un genou OA. La figure montre les changements dans les différents tissus tels que la formation d'ostéophytes, la dégradation du cartilage, les dommages au ménisque, le remodelage et la sclérose des os et une hypertrophie de la membrane synoviale (Hunter and Felson, 2006).

Les cytokines pro-inflammatoires semblent elles aussi contribuer aux modifications de la matrice. Elles ont la capacité d'induire, dans les chondrocytes, l'expression de MMPs, d'aggrécánases et d'autres gènes cataboliques (Middleton et al., 1996; Moos et al., 1999; Attur et al., 2000). Dans le cartilage OA, l'augmentation de la dégradation de la matrice est corrélée par une augmentation du niveau d'expression de plusieurs MMPs incluant la MMP-1, la MMP-7, la MMP membranaire type I, la MMP-8, l'ADAM-10 et l'ADAM-15 (Chubinskaya et al., 1996; Imai et al., 1997; Shlopov et al., 1997; Ohta et al., 1998; Chubinskaya et al., 1998; Bohm et al., 1999). De plus, le niveau d'expression de la MMP-13 est plus élevé chez les patients atteints de l'OA et de l'arthrite rhumatoïde (RA) et ce particulièrement dans le cartilage articulaire (Reboul et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Stahle-Backdahl et al., 1997).

Face au développement de cette maladie, les chondrocytes peuvent adopter plusieurs comportements. Ils peuvent mourir par mort programmée (apoptose) ou non (nécrose), proliférer pour compenser la perte des cellules mortes ou encore augmenter leur activité cellulaire.

Le cartilage OA est caractérisé par une diminution du nombre de chondrocytes total qui peut influencer le développement de la maladie. En effet, les chondrocytes sont séparés par une matrice territoriale et interterritoriale ce qui suggère un faible taux de repeuplement aux endroits où les cellules sont mortes. La baisse de population en chondrocytes pourrait entraîner une diminution de la capacité du cartilage à maintenir l'intégrité de la matrice extracellulaire (Blanco et al., 2004). Dans la littérature, l'analyse

de l'apoptose dans des tissus à différents degrés d'OA révèle une corrélation significative entre le degré d'OA et l'apoptose des chondrocytes (Hashimoto et al., 1998a). De plus, le taux d'apoptose dans le cartilage OA est plus élevé comparativement au cartilage normal. Ce phénomène a été observé dans plusieurs études dont des modèles animaux et cliniques de l'OA (Venn, 1978;Bendele and White, 1987;Blanco et al., 1998;Hashimoto et al., 1998a).

Plusieurs études montrent que contrairement aux chondrocytes normaux, les chondrocytes OA ont une activité proliférative qui demeure toutefois très faible (Mankin et al., 1971;Hulth et al., 1972;Rothwell and Bentley, 1973). L'apparition d'une activité proliférative peut s'expliquer par une modification du phénotype des chondrocytes menant à une expression altérée des gènes impliqués dans la prolifération. De plus, l'augmentation de l'activité proliférative des chondrocytes se situe, en particulier, dans les couches supérieures du cartilage. Ceci pourrait être attribuée à une augmentation de l'accessibilité des cellules aux facteurs de croissance provenant du liquide synovial. La modification de l'accessibilité peut être causée par des fissures, une perte du réseau de collagène, mais aussi par une modification de l'intégrité de la matrice qui est particulièrement altérée dans les couches supérieures du cartilage OA (Meachim and Collins, 1962;Hollander et al., 1995). L'augmentation de la prolifération cellulaire peut aussi être une réponse pour contrer la destruction du cartilage. Toutefois, ce mécanisme semble est insuffisant pour permettre une réparation efficace de ce tissu grandement affecté dans l'OA (Hulth et al., 1972).

## - L'os

Contrairement au cartilage, l'os contient trois différents types cellulaires, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Chacun de ces types cellulaires joue un rôle important et distinct dans la régulation de l'os. Les os, en particulier l'os sous-chondral, ont souvent eu un rôle secondaire dans le développement de cette maladie. Toutefois, il semble aujourd'hui que leur implication soit de plus en plus importante. En effet, les modèles cliniques et expérimentaux d'OA montrent une modification de l'épaisseur de l'os sous-chondral ainsi qu'une modification du métabolisme des ostéoblastes (Lajeunesse et al., 1999;Lajeunesse and Reboul, 2003). De plus, dans cette maladie, la progression de la dégradation du cartilage est associée à un remodelage intensif de l'os sous-chondral et à une augmentation de la rigidité de l'os (Burr and Schaffler, 1997).

Des études récentes suggèrent un rôle clé de l'os sous-chondral dans la progression et peut être dans l'initiation de l'OA possiblement via la production de cytokines et de facteurs de croissance (Burr and Schaffler, 1997;Burr, 1998;Imhof et al., 1999). Plus précisément, le tissu osseux produit plusieurs cytokines pro-inflammatoires ainsi que des facteurs de croissance impliqués dans le remodelage du tissu et dans le catabolisme du cartilage. Les fissures et les canaux, présents tôt dans l'os OA, pourraient permettre le passage de cytokines et de facteurs de croissance provenant du compartiment sous-chondral vers le cartilage et ainsi perturber le métabolisme de celui-ci (Mital and Millington, 1970;Sokoloff, 1993;Westacott et al., 1997;Guevremont et al., 2003). L'IGF-1, le TGF- $\beta$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 sont soupçonnés d'être des candidats possibles. En effet, les

niveaux de l'IGF-1, de l'IGF-2 et du TGF- $\beta$  sont plus élevés dans les échantillons provenant de la crête de l'os iliaque chez les patients souffrant d'OA comparativement aux normaux (Dequeker et al., 1993). De plus, dans l'OA, il y a une augmentation de la production des cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Pelletier et al., 2001).

### - La Synoviale

Lors de la dégradation du cartilage, les produits de la décomposition, libérés dans le liquide synovial, sont phagocytés par les macrophages de la membrane synoviale. Conséquemment, la membrane devient hypertrophiée et hyperplastique (Fernandes et al., 2002). Plusieurs études ont rapportées des aspects inflammatoires au niveau de la membrane synoviale chez les patients OA qui sont parfois indiscernables de ceux retrouvés chez les patients atteints d'arthrite inflammatoire comme l'AR (Lindblad and Hedfors, 1987; Myers et al., 1990; Haraoui et al., 1991; Farahat et al., 1993). De plus, les synoviocytes OA présentent un déficit au niveau de la production du récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra) ainsi qu'une augmentation du niveau du récepteur de l'IL-1 $\beta$  (IL-1R). Ces caractéristiques peuvent causer une augmentation de l'effet catabolique de l'IL-1 dans cette maladie (Fernandes et al., 2002).

Dans chacune des parties de l'articulation précédemment décrite, les cytokines semblent être impliquées dans l'OA. Leur implication dans cette pathologie sera abordée dans le prochain paragraphe.

### 1.3.2. Les cytokines

Les cytokines semblent être impliquées dans l'OA. Les cytokines, produites par les synoviocytes, les cellules mononucléaires et les chondrocytes, jouent un rôle important dans la destruction de la matrice du cartilage OA. Les investigations effectuées sur des chondrocytes suggèrent que les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  contribuent à la dérégulation des fonctions des chondrocytes et conduisent à la dégradation de la matrice du cartilage (Sandy et al., 1991; Martel-Pelletier et al., 1992; Aydelotte et al., 1992; Ilic et al., 1992; Loulakis et al., 1992; Isomaki and Punnonen, 1997; Arner et al., 1998).

Ces deux cytokines, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , semblent être les principaux modulateurs des voies cataboliques impliquées dans la destruction des tissus de l'articulation. Ces cytokines ont la capacité d'induire la destruction du cartilage par l'inhibition de la synthèse du collagène et des protéoglycanes ainsi que par l'augmentation de la synthèse des MMPs et du NO. Dans les modèles animaux, il semble que l'inhibition de l'IL-1 $\beta$  prévient la destruction du cartilage, alors que celle du TNF- $\alpha$  provoque une diminution de l'inflammation (van de Loo et al., 1995; Plows et al., 1995). De plus, elles ont la capacité d'induire, dans les chondrocytes, la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. Cette cytokine favorise l'augmentation de produits qui vont réguler à la baisse l'inflammation comme l'IL-1Ra et les inhibiteurs des MMPs et inhiber la synthèse du TNF (Aderka et al., 1989; Lotz and Guerne, 1991). À l'opposé, il augmente le nombre de cellules inflammatoires dans le tissu synovial, stimule la prolifération des chondrocytes et induit une amplification de l'effet de l'IL-1 (Guerne et al., 1989; Nietfeld et al., 1990).



L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  agissent également sur le facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui est sous la forme inactive dans le cytosol. En présence de l'IL-1 $\beta$  ou du TNF- $\alpha$ , le NF- $\kappa$ B sera activé puis transloqué dans le noyau où il induira l'expression d'une grande variété de gènes. Les MMPs, les molécules d'adhésion, l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) en sont quelques exemples. Dans les chondrocytes, cette voie de signalisation est indispensable à l'expression de la MMP-1, de la MMP-3 et de la MMP-13 (Mengshol et al., 2000; Elliott et al., 2002; Vincenti and Brinckerhoff, 2002; Liacini et al., 2003).

À l'opposé de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$ , il y a des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, IL-10, IL-13 et IL-1Ra. Deux de ces cytokines, l'IL-4 et IL-10 semblent, *in vitro*, avoir la capacité de renverser certains effets des cytokines cataboliques et en conséquence d'inhiber la dégradation du cartilage par les protéinases. *In vivo*, elles favorisent la suppression de la destruction du cartilage (Shingu et al., 1995; Cawston et al., 1996; Salter et al., 1996; Lubberts et al., 2000a; Lubberts et al., 2000b; van Roon et al., 2001; Iannone et al., 2001; Wang and Lou, 2001; Guicheux et al., 2002). De surcroît, ces deux cytokines ainsi que l'IL-13 ont la capacité de diminuer, dans les synoviocytes et les chondrocytes OA, la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  et de stimuler la production de leurs récepteurs antagonistes soit IL-1Ra et le récepteur soluble du TNF- $\alpha$  (Jovanovic et al., 1998; Alaaeddine et al., 1999; Moo et al., 2001; Fernandes et al., 2002).

Lors de la stimulation des chondrocytes OA par des cytokines pro-inflammatoires, il y aura une augmentation de l'ARNm et du niveau protéique de l'iNOS qui est responsable de la synthèse du NO. De plus, il y a une augmentation du niveau de nitrite/nitrate dans le liquide synovial des patients OA (Farrell et al., 1992;McInnes et al., 1996). Le NO est un facteur impliqué dans le catabolisme du cartilage et induit l'apoptose des chondrocytes OA (Blanco et al., 1995). Plus précisément, il peut conduire à la dégradation et à l'inhibition de la synthèse de la matrice extracellulaire par la régulation de plusieurs facteurs biochimiques impliqués dans la dégradation du cartilage tels que les MMPs et en causant des dommages à toutes les composantes de la matrice (Taskiran et al., 1994;Murrell et al., 1995;Sasaki et al., 1998). Les dommages peuvent être causés directement lorsque le NO attaque les composantes ou indirectement lorsqu'il diminue la synthèse de celles-ci (Hashimoto et al., 1998b;Li et al., 2004).

### **1.3.3. L'incidence de l'OA**

L'OA, touchant toutes les ethnies, est retrouvée dans toutes les régions du monde avec une incidence plus grande chez la femme (Buckwalter et al., 2004). L'organisation mondiale de la santé estime qu'environ 10% de la population mondiale âgée de plus de 60 ans souffrent d'OA, 80% de cette population ont des mouvements limités et 25% ne peuvent pas exécuter leurs principales activités quotidiennes (Buckwalter et al., 2004). Bien que l'OA affecte les mains et la colonne vertébrale, les articulations les plus touchées par cette maladie sont les genoux et les hanches (Buckwalter et al., 2004).

#### **1.3.4. Les facteurs de risque**

L'OA a longtemps été considéré comme une maladie résultante d'un traumatisme ou du vieillissement. Ce concept a toutefois évolué et elle est maintenant considérée comme une maladie multifactorielle, en partie causée par une composante génétique et/ou immunologique et des mécanismes de stress (Martel-Pelletier, 1999;Kouri and Lavalle, 2006). En effet, l'âge, le sexe, la génétique, la densité osseuse, les facteurs hormonaux et l'obésité ne sont que quelques-unes des causes possibles de l'OA (Sarzi-Puttini et al., 2005). Leur implication comme facteur de risque sera abordé dans les prochains paragraphes.

##### **- L'âge**

L'âge joue un rôle substantiel dans l'augmentation de l'incidence et de la prévalence de l'OA (Lawrence et al., 1966;Felson et al., 1987;Felson et al., 1995). Toutes les articulations susceptibles d'être affectées par l'OA sont sous l'influence de ce facteur de risque. Toutefois, son importance est particulièrement prononcée pour les genoux, les mains et les hanches. L'importance de ce facteur de risque est probablement causée par l'augmentation, avec l'âge, d'une variété de facteurs de risque biomécaniques, systémiques et locaux.

##### **- Le genre**

Dans la littérature, le genre est considéré comme un facteur de risque, son implication est toutefois restreinte à quelques articulations. En effet, la prévalence et

l'incidence de l'OA au niveau des mains et des genoux est significativement plus grande chez la femme, alors que pour les hanches, il y a la même progression en fonction de l'âge pour les deux sexes (Kellgren and Moore, 1952; Oliveria et al., 1995). Le genre peut aussi influencer le développement de la maladie. En effet, l'OA des mains progresse plus rapidement chez la femme, alors que, l'OA des genoux progresse à la même vitesse pour les deux sexes (Schouten et al., 1992; Ledingham et al., 1993; Felson et al., 1995; Dougados et al., 1996).

### - La génétique

La génétique peut être l'un des facteurs expliquant le développement précoce de l'OA chez certaines familles. Les variances génétiques telles que des anomalies au niveau du collagène des chondrocytes ou des aggrecanes peuvent expliquer ce phénomène. Ces anomalies peuvent se situer au niveau de la fragilité, de la quantité ou de la structure moléculaire. La contribution génétique dans le développement de l'OA au niveau des mains, des hanches et des genoux chez la femme et au niveau des hanches chez l'homme a été rapportée dans plusieurs articles (Spector et al., 1996; Kaprio et al., 1996; Felson et al., 1998; MacGregor et al., 2000; Lanyon et al., 2000; Ingvarsson et al., 2000; Jonsson et al., 2003). Ces études suggèrent l'implication de plusieurs gènes ainsi que de facteurs environnementaux dans la possibilité de développer cette maladie. Le gène de l'IGF-1, le gène du récepteur à la vitamine D, les gènes des protéines d'oligomérisation et la région HLA sont parmi les candidats possibles. De plus, il semble qu'une région du chromosome 2q et du chromosome 11q pourrait être liée à l'OA (Wright et al., 1996; Chapman et al., 1999).

### - Les facteurs hormonaux et la densité osseuse

Les hormones et la densité osseuse semblent influencer le risque de développer l'OA. En effet, les femmes, après la ménopause, ont un risque plus élevé de développer l'OA. Ceci peut s'expliquer, en partie, par un déficit en œstrogène qui semble avoir un effet protecteur (Zhang et al., 1998). Semblable à l'œstrogène, l'ostéoprotégène semble avoir, elle aussi, un effet protecteur contre l'OA. En effet, la majorité des études montrent qu'une forte densité osseuse est associée à une augmentation de la prévalence de l'OA pour les hanches, les genoux et les mains (Lane et al., 1999). Plusieurs hypothèses ont été formées mais aucun consensus n'a été obtenu pour expliquer le lien entre la densité osseuse et la prévalence de l'OA.

### - L'obésité

L'obésité est un facteur de risque important dans le développement de l'OA. En effet, au niveau du genou, il est le facteur de risque prédominant et le mieux caractérisé (Felson et al., 2000). Il a clairement été démontré que l'obésité précède, de plusieurs années, le développement de l'OA au niveau de cette articulation et accélère la détérioration de sa structure (Schouten et al., 1992;Spector et al., 1994;Felson et al., 1997;Gelber et al., 1999;Cooper et al., 2000). De plus, la perte de poids réduit le risque de développer, dans l'avenir, l'OA au niveau des genoux (Felson et al., 1992). L'obésité est aussi un facteur de risque pour l'OA au niveau des hanches, toutefois, il est moins important que pour les genoux (Vingard et al., 1997;Cooper et al., 1998;Karlson et al.,

2003). Contrairement aux articulations précédentes, l'association entre l'obésité et l'OA au niveau des mains est plus nébuleuse car certaines études notent une association alors que d'autres non (Hochberg et al., 1993;Carman et al., 1994;Vingard et al., 1997;Cooper et al., 1998;Oliveria et al., 1999;Karlson et al., 2003).

### - Les sports

La participation à certains sports peut contribuer à augmenter la prévalence de l'OA dépendamment de l'activité. Par exemple, la course pratiquée avec modération n'a aucun effet sur l'incidence de l'OA. Cependant, les activités qui sont d'une grande intensité, qui ont un impact direct sur les articulations, qui demande le port d'un équipement lourd ou qui se pratique sur une surface consacrée à ce sport semblent augmenter le risque de développer l'OA. Par exemple, les joueurs de football et de hockey sont à haut risque de développer l'OA aux genoux (Lequesne et al., 1997;Lievense et al., 2003).

### 1.3.5. Les traitements

Plusieurs traitements peuvent être envisagés dépendamment de la sévérité de la douleur. Ces traitements qui sont individualisés, sont prescrits en s'appuyant sur le ratio risque/bénéfice. En premier lieu, il est recommandé d'opter pour un traitement non pharmacologique comme l'exercice et la réhabilitation physique. Après l'échec de ce type de traitement, les patients légèrement et modérément affectés peuvent opter pour l'utilisation d'analgésique comme l'acétaminophène ou des anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Ces derniers semblent, selon plusieurs études, être plus efficaces dû à la

capacité de certains à inhiber les COX, une enzyme importante dans l'inflammation. La découverte de la COX-2, une isoforme inductible de la COX, a permis le développement d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens sélectifs de cette enzyme avec le même pouvoir analgésique que leurs homologues non-sélectifs tout en diminuant les effets secondaires apportés par l'inhibition de la COX-1 (une forme constitutive de la COX)(Sarzi-Puttini et al., 2005).

Pour les cas d'OA plus sévère, la thérapie basée sur l'utilisation d'opioïde, toutefois limité par la tolérance, la dépendance et les effets secondaires, est conseillée (Sarzi-Puttini et al., 2005). D'autres traitements peuvent être utilisés comme les analgésiques locaux et des administrations de stéroïdes dans l'articulation. La chirurgie est envisagée lorsque les méthodes non chirurgicales, précédemment décrite, ont échoué. Aucun traitement n'existe présentement pour guérir l'OA car la cause exacte de cette maladie est inconnue. Toutefois, plusieurs voies sont étudiées pour tenter de découvrir les mécanismes impliqués dans cette pathologie. Parmi celle-ci la mort cellulaire des chondrocytes semble se produire précocement dans le développement de l'OA (Lust and Summers, 1981;Piperno et al., 1998).

#### **1.4. LA MORT CELLULAIRE**

Les cellules ont plusieurs mécanismes pour réparer les dommages causés par plusieurs facteurs. Toutefois, lorsque les dommages ne peuvent être réparés, la cellule meurt. Il existe deux types de mort cellulaire, l'apoptose et la nécrose qui ont des mécanismes et une morphologie cellulaire distincts. Toutefois, il est clair que ces deux

voies partagent des dispositifs communs comme illustrés à la figure 3. Chacune de ces voies sera caractérisée dans les prochains paragraphes.

#### **1.4.1. La nécrose**

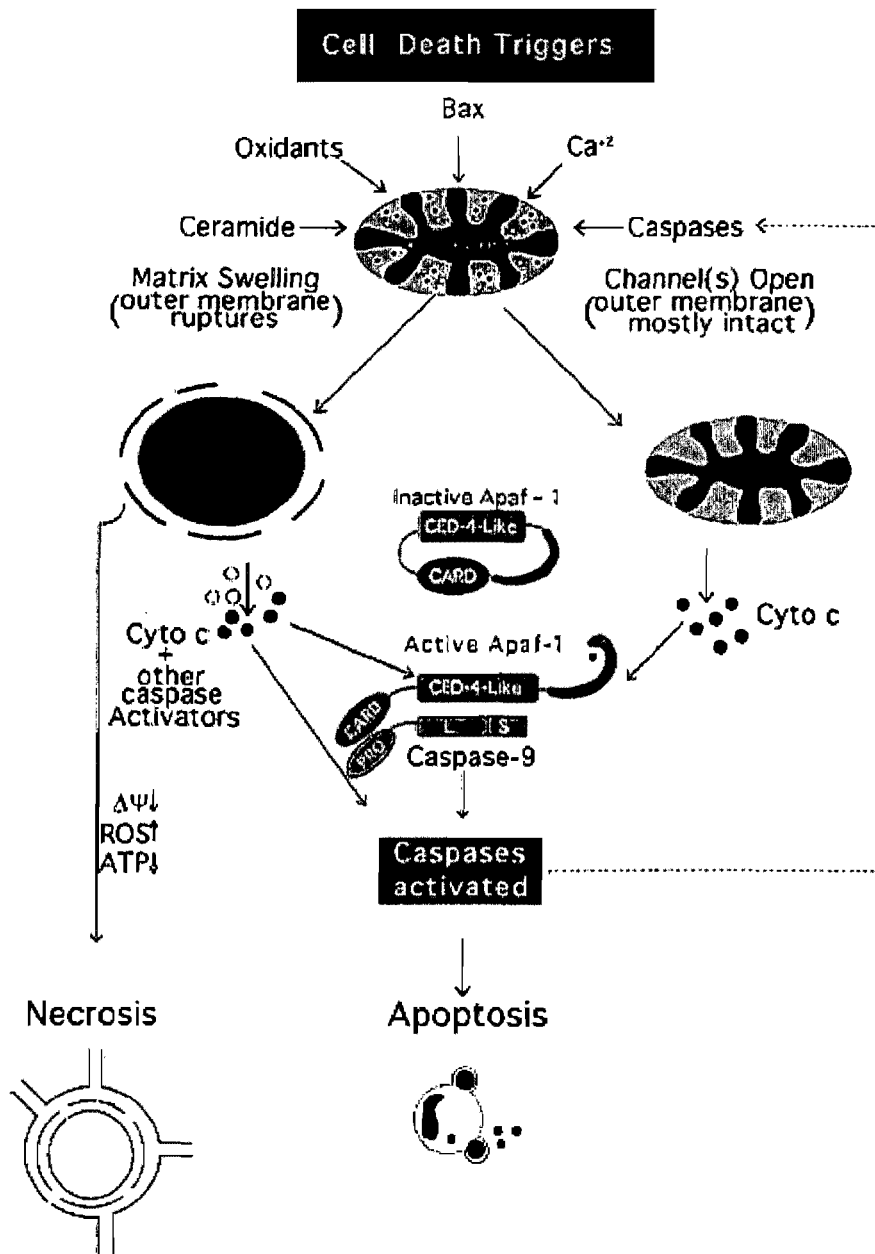
La nécrose est une voie peu étudiée dans la littérature car, contrairement à l'apoptose, elle est une mort cellulaire non programmée ou accidentelle qui se produit sans l'activation d'une voie intracellulaire spécifique. Cette mort cellulaire est caractérisée par une distension et une rupture de la membrane cellulaire qui conduit à la libération du contenu de la cellule et à la production de débris pro-inflammatoires pouvant conduire à une réponse inflammatoire (Leist et al., 1997; Nicotera and Melino, 2004).

#### **1.4.2. L'apoptose**

La seconde possibilité est de voir la cellule mourir par apoptose. L'apoptose se différencie de la nécrose par des caractéristiques telles que des altérations de la morphologie, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la diminution du volume de la cellule et la formation de corps apoptotiques lorsque la cellule est au dernier stade de ce processus (Goggs et al., 2003).

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui est impliquée dans les processus physiologiques normaux du maintien de l'homéostasie (Majno and Joris, 1995). Elle permet essentiellement de maintenir l'intégrité tissulaire par l'élimination des cellules



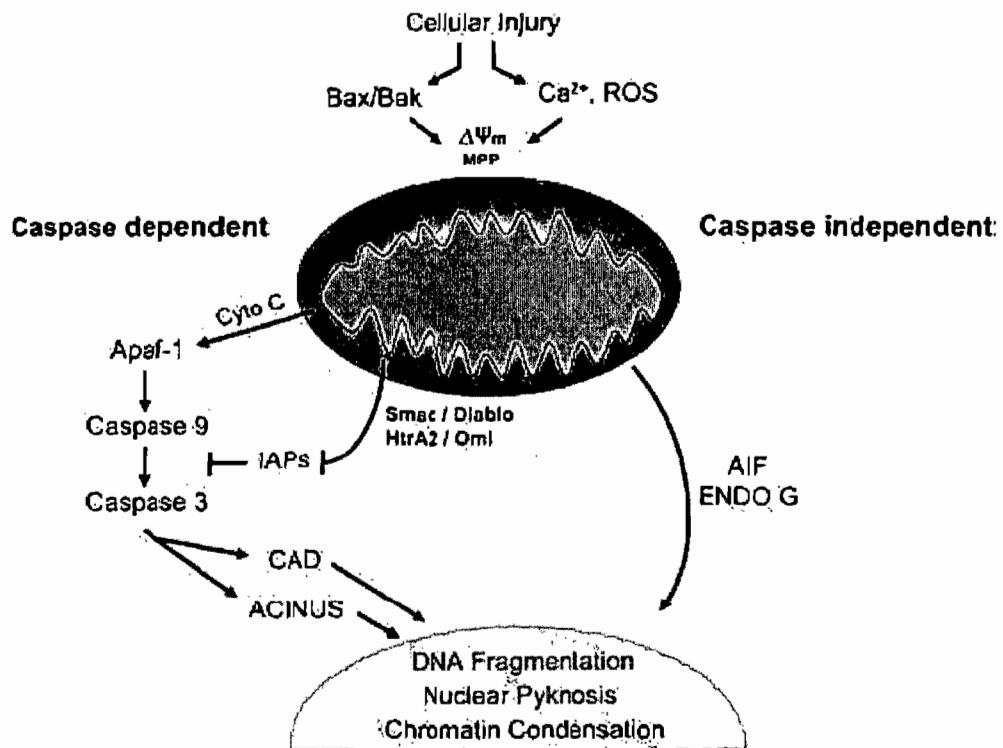


**Figure 3 :** Représentation des voies conduisant à la mort cellulaire soit par nécrose ou par apoptose. La nécrose survient suite à la rupture de la membrane alors que l'apoptose survient suite à l'ouverture des canaux. L'ouverture des canaux conduira à la libération du cytochrome *c*, à l'activation de la caspase-9 et à l'activation des caspases effectrices (Green and Reed, 1998).

infectées, ayant subi des dommages irréparable à l'ADN ou avec une transcription des gènes inappropriées. L'apoptose peut aussi être impliquée dans plusieurs maladies, en particulier dans les maladies dégénératives du système nerveux (Fink et al., 1999). Le processus apoptotique peut se faire via deux voies, une voie caspase dépendante et une voie caspase indépendante comme illustrées à la figure 4 (Zamzami et al., 1995; Petit et al., 1995; Kroemer et al., 1997; Green and Reed, 1998; Loeffler and Kroemer, 2000). La mitochondrie occupe une place importante dans ces deux voies apoptotiques décrites dans le prochain paragraphe. En effet, les signes classiques de mort cellulaire sont précédés par des altérations de la mitochondrie incluant une perte du potentiel membranaire, une diminution de la production d'énergie, une augmentation de la perméabilité membranaire et la libération de facteurs pro-apoptotiques (Vayssiere et al., 1994; Cleeter et al., 1994; Zamzami et al., 1995; Petit et al., 1995; Kroemer et al., 1997; Petit et al., 1997; Kluck et al., 1997; Nicotera et al., 1998; Crompton, 1999; Vander Heiden et al., 2000)

### **1.4.3. Les mécanismes de l'apoptose**

Le processus apoptotique est complexe et de nombreuses protéines en assurent la régulation. Dans un premier volet, la voie classique de l'apoptose est dépendante des caspases. Cette voie qui est priorisée dans les études, peut être induite suite à l'activation en amont d'une voie intrinsèque ou d'une voie extrinsèque. La voie extrinsèque est induite suite à l'activation d'un récepteur de mort comme TNF-R, IL-R, Fas et TRAIL-R qui clivera la caspase-8, une caspase initiatrice. La caspase-8 pourra alors activer des caspases effectrices indépendamment des mitochondries, comme la caspase-3 ou encore



**Figure 4 :** Représentation de la voie apoptotique caspase-dépendante et caspase-indépendante. L'activation de la voie caspase-dépendante qui nécessite l'activation des caspases se produit suite à la libération du cytochrome *c*. La voie caspase-indépendante consiste à la libération de l'endonucléase G (EndoG) et l'apoptosis-inducing factor (AIF) de la mitochondrie. Cette voie peut être activée indépendamment des caspases (Cregan et al., 2004).

cliver la protéine pro-apoptotique Bid qui sera transloquée dans la mitochondrie et causera la libération du cytochrome *c* et l'activation de la cascade apoptotique intrinsèque. La libération par la mitochondrie du cytochrome *c* conduira à la formation de l'apoptosome, formé du cytochrome *c*, de l'*apoptotic protease-activating factor* (Apaf-1) et de la pro-caspase-9, qui permettra l'activation de la caspase-9. Par la suite, la caspase-8 et -9 activées dans les deux voies précédentes, vont cliver la pro-caspase-3 en caspase-3 active qui à son tour clivera les protéines utiles de la cellule.

Dans un second volet, l'apoptose peut se produire en absence complète et indépendamment de l'activation des caspases. Cette voie, caspase-indépendante, est régulée principalement par l'EndoG et l'AIF. Comme dans la voie précédente, la mitochondrie y joue un rôle central. Les principaux acteurs de la voie caspase-dépendante et caspase-indépendante seront décrit plus en détail dans les prochains paragraphes.

### - Les caspases

La voie classique de l'apoptose est dépendante d'une famille de protéases, les caspases. Elles sont synthétisées par la cellule sous forme inactive (pro-caspase). Pour devenir active, elles subissent un clivage au niveau d'un acide aminé spécifique, l'acide aspartique. Les caspases, une fois activées, vont cliver d'autres protéines cibles dans la cellule au niveau d'acides aspartiques spécifiques. Les caspases activées peuvent aussi cliver d'autres pro-caspases, provoquant ainsi un effet d'amplification. Les différentes caspases peuvent être classées en trois groupes: la famille des caspases-1, des caspases-2 et des caspases-3. La famille des caspases-1 est composée de la caspase-1, -4, -5, -11, -12

et -14 (Hu et al., 1998). Ces caspases qui sont impliquées dans la réponse inflammatoire peuvent agir en induisant la sécrétion des cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-16, IL-18 et indirectement le TNF- $\gamma$ ) ou encore en induisant l'activation de caspases impliquées dans la libération de ces cytokines (Van de et al., 1999). La famille des caspases-2 (caspase-2, -8, -9, -10) regroupe les caspases initiatrices de l'apoptose. Elle vont conduire à l'activation des caspases effectrices qui constituent la famille des caspase-3 (caspase-3, -6, -7) (Hu et al., 1998).

#### - Les calpaines

En plus des caspases, il y a une autre famille de protéases impliquées dans la cascade apoptotique, les calpaines. Elles sont synthétisées sous forme d'une pro-enzyme inactive qui sera activée suite à l'augmentation du niveau intracellulaire de calcium. Les calpaines regroupent deux isoenzymes la première la  $\mu$ -calpaine et la seconde la m-calpaine. Elles sont activées, *in vitro*, par des concentrations de calcium de l'ordre du micromolaire et du millimolaire respectivement (Croall and DeMartino, 1991). Ces protéases ont une large variété de substrats incluant des pro-enzymes, des phosphatases, des protéinases, des protéines kinases, des protéines du cytosquelette et des protéines membranaires impliquées dans la mort cellulaire. Les calpaines peuvent aussi dégrader les composantes de la matrice extracellulaire comme les protéoglycanes et les fibronectines conduisant à la destruction du cartilage. Fait intéressant, il a été démontré dans la littérature que le liquide synovial des patients atteints d'OA et de RA contient des niveaux plus élevés de calpaines actives. De plus, les chondrocytes atteints de ces deux

pathologies sécrètent des calpaines sous la forme active. (Suzuki et al., 1990; Yamamoto et al., 1992; Szomor et al., 1995).

#### **1.4.4. La mitochondrie**

Comme décrit précédemment, la mitochondrie est une organelle qui joue un rôle central dans la voie apoptotique caspase-dépendante et caspase-indépendante. Elle agit en libérant différents facteurs pro-apoptotiques lorsque des stimuli de la mort cellulaire affectent la perméabilité de sa membrane. La perméabilité est, en partie, régulée par les protéines faisant partie de la famille de Bcl-2 qui inhibent la mort cellulaire ou celles comme Bak et Bax qui induisent l'apoptose (Goping et al., 1998; Gross et al., 1998; Ruffolo et al., 2000). Un déséquilibre entre ces différents facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques perturbera la perméabilité membranaire de la mitochondrie. De plus, les molécules apoptotiques peuvent être libérées de la mitochondrie indépendamment de Bax/Bak par des perturbations cellulaires qui causent une augmentation du calcium intracellulaire. La dysfonction de la mitochondrie favorise la libération de facteurs de la mort cellulaire comme le cytochrome *c*, Smac/DIABLO, et Omi/HtrA2 qui sont impliqués dans la voie caspase-dépendante et l'AIF et EndoG qui sont impliqués dans la voie caspase-indépendante. Leur rôle dans l'apoptose sera abordé dans les prochains paragraphes.

### - **Le cytochrome *c***

Le facteur apoptotique le plus notoire, libéré de la mitochondrie, est le cytochrome *c* (Kluck et al., 1997; Deshmukh and Johnson, Jr., 1998). C'est un facteur pro-apoptotique lié sur la surface externe de la membrane interne de la mitochondrie. L'activation de la voie intrinsèque débute par la libération du cytochrome *c*. Une fois libéré, il se combinera avec d'autres protéines cytosoliques (Apaf-1 et pro-caspase-9) résultant en l'activation de la pro-caspase-9 en sa forme active.

### - **Smac/Diablo et HtrA2/Omi**

Plus récemment, il a été démontré que d'autres facteurs pro-apoptotiques comme Smac/Diablo et HtrA2/Omi peuvent être libérés par la mitochondrie (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Suzuki et al., 2001). Ces facteurs pro-apoptotiques semblent faciliter l'activation des caspases par leur capacité à se lier et à inhiber des protéines faisant partie de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) (Liu et al., 2000b; Martins et al., 2002). De plus, HtrA2/Omi possèdent une activité serine protéase qui semble contribuer à un processus de la mort cellulaire indépendant des caspases (Suzuki et al., 2001).

### - **AIF et endo G**

La mitochondrie peut aussi libérer, indépendamment des caspases et de la libération du cytochrome *c*, des facteurs impliqués dans la mort cellulaire tels que l'EndoG et l'AIF (Susin et al., 1999; Li et al., 2001; van et al., 2001); (Cande et al., 2004). L'AIF est une

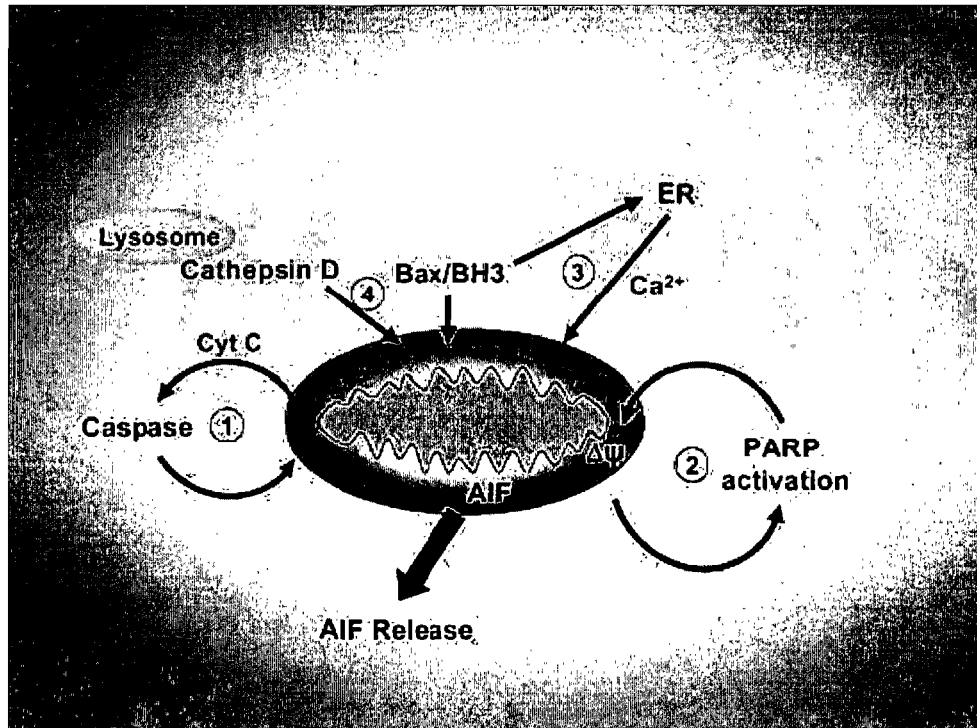
flavoprotéine localisée dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Lors de l'ouverture du pore de transition et de perméabilité de la mitochondrie, suite à plusieurs stimuli (figure 5), l'AIF sera libéré dans le cytosol. Par la suite, l'AIF sera transloqué dans le noyau et induira la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, possiblement par sa liaison avec ce dernier (Susin et al., 1999;Ye et al., 2002). L'AIF a la capacité d'induire l'apoptose indépendamment des caspases car l'inhibition de l'activation des caspases ou de leur activité ne parvient pas toujours à abolir la fonction pro-apoptotique de l'AIF (Daugas et al., 2000). De plus, le signal de la mort cellulaire qui induit la translocation de l'AIF peut être observé lorsque la cellule est dépourvu génétiquement de l'Apaf-1, de la caspase-9 ou de la caspase-3 (Susin et al., 2000;Joza et al., 2001;Cregan et al., 2002).

L'EndoG, comme l'AIF, peut être transloqué de la mitochondrie vers le noyau en passant par le cytoplasme durant le processus apoptotique. De plus, il a la capacité d'induire la fragmentation de l'ADN indépendamment des caspases (Li et al., 2001).

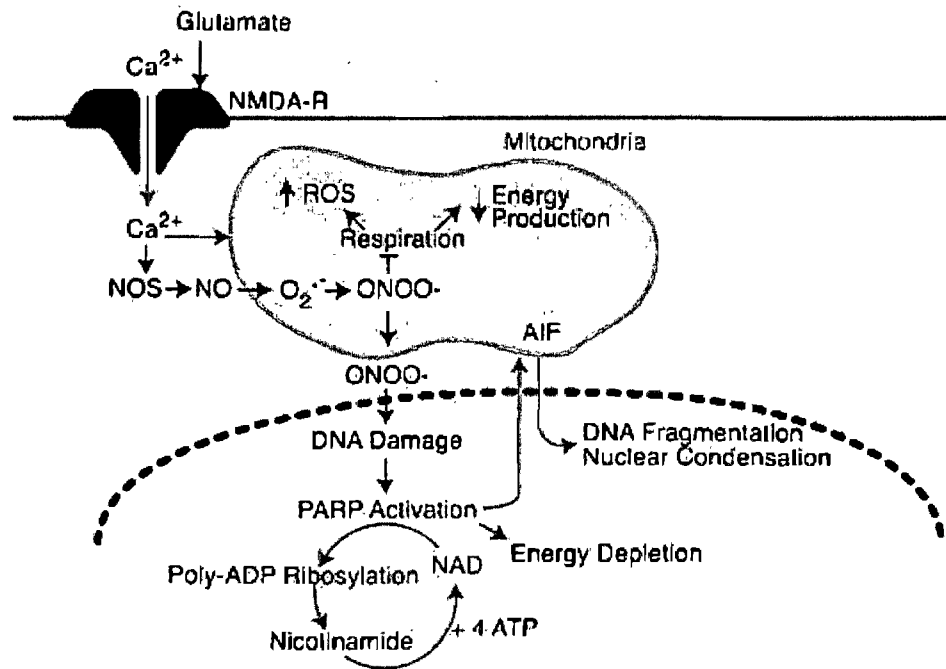
#### - **La Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP-1)**

La PARP est une enzyme nucléaire impliquée dans la mort cellulaire. Elle facilite la libération de l'AIF de la mitochondrie vers le cytosol (figure 6) (Yu et al., 2002). En effet, les activateurs de la PARP-1, incluant l'agent alkylant de l'ADN, le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, induisent la translocation de l'AIF et la condensation du noyau. L'activation de la PARP-1, suite à son clivage en deux fragments (89 et 24 kDa), se





**Figure 5 :** Mécanismes possibles conduisant à la libération de l'AIF par la mitochondrie. Plusieurs stimuli peuvent conduire à la libération de l'AIF incluant la PARP, les caspases, le calcium et la cathepsine D (Cregan et al., 2004).



**Figure 6:** Implication de la PARP dans le processus apoptotique. L'activation de la PARP lors de dommages à l'ADN va induire la libération de l'AIF par la mitochondrie (Cregan et al., 2004).

produit lorsqu'il y a des dommages à l'ADN (Kaufmann et al., 1993;Lazebnik et al., 1994). La PARP-1 est impliquée dans la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire. Le rôle de la PARP-1 dans la régulation la réplication est controversée, toutefois l'inhibition de la PARP semble montrer une inhibition de la réplication, de la prolifération et de la différenciation dans plusieurs modèles expérimentaux (D'Amours et al., 1999). De plus la PARP-1 joue un rôle dans la mort cellulaire; une activation massive de la PARP lors de dommages excessif à l'ADN conduira à la mort cellulaire par apoptose en induisant la libération de l'AIF (Lautier et al., 1993;de and Menissier de, 1994;Shall and de, 2000;Virag and Szabo, 2002).

#### **1.4.5. L'OA et l'apoptose**

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée bénéfique pour le remodelage cartilagineux. Cependant, il existe deux caractéristiques du cartilage qui rendent l'apoptose des chondrocytes néfaste pour ce tissu. Premièrement, l'absence de cellules phagocytaires implique que les cellules mortes ne seront pas phagocytées et demeureront dans la matrice extracellulaire affectant potentiellement la structure de la matrice ainsi que le fonctionnement des chondrocytes viables. De plus, la présence de ces corps apoptotiques pourrait expliquer la calcification anormale du cartilage observée chez les patients OA. En effet, les corps apoptotiques ont la capacité de faire précipiter le calcium (Goggs et al., 2003). Deuxièmement, le cartilage ne contient pas de cellules souches mésenchymateuses et n'est pas vascularisé. Il peut donc difficilement être repeuplé par d'autres cellules.

La mort des chondrocytes par apoptose semble jouer un rôle central dans l'altération du cartilage et possiblement dans le développement de l'OA (Lotz et al., 1999). L'apoptose est observée dans le cartilage de patients atteints d'OA et de RA (Yoshimura et al., 2006). Dans le cartilage OA, il est possible d'observer de la condensation nucléaire, des lacunes vides, la perte d'organelles intracellulaires et une perte de l'intégrité de la matrice (Weiss and Mirow, 1972). Ces observations semblent indiquer la présence d'apoptose. De plus, la plupart des études portant sur ce sujet voient une augmentation de la mort cellulaire par apoptose dans l'OA. Toutefois, la fréquence des cellules apoptotiques rapportée forme un grand éventail. La cause exacte de l'apoptose des chondrocytes OA n'est pas parfaitement établi, il semble que plusieurs stimuli pourraient être impliqués.

#### **1.4.6. Les causes de l'apoptose dans les chondrocytes**

Dans la littérature, plusieurs stimuli peuvent conduire à l'apoptose des chondrocytes. Le NO et l'activation du récepteur Fas en sont des exemples. De plus, des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  sont perçus comme des causes possibles de la dégradation du cartilage humain via l'induction de l'apoptose des chondrocytes (Yoshimura et al., 2006).

Le NO est l'un des facteurs qui semble être impliqué dans l'apoptose des chondrocytes. En effet, il a été démontré que le NO est produit en grande quantité par les chondrocytes suite à leur stimulation par les cytokines pro-inflammatoires (Stadler et al.,

1991). De plus, la prévalence des chondrocytes apoptotiques est corrélée significativement avec le niveau de nitrite dans les tissus et avec le degré d'OA dans le model du lapin (Hashimoto et al., 1998b). Dans les chondrocytes, un excès de NO peut causer le bris des brins d'ADN, la modification des lipides et des protéines, la dégradation et l'inhibition de la synthèse de la matrice du cartilage et finalement l'induction de l'apoptose (Notoya et al., 2000).

Les cytokines pro-inflammatoires semblent elles aussi impliquées dans l'apoptose des chondrocytes. Parmi ces cytokines, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  semblent être les plus impliqués. Toutefois, elles régulent différemment les mécanismes d'apoptose dans les chondrocytes OA. Le TNF- $\alpha$  produit une augmentation graduelle de l'ARNm de la caspase-1 et -8 contrairement à l'IL-1 $\beta$ . De plus, la séquence d'induction de la caspase-3 et -7 est différente pour le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Lopez-Armada et al., 2006). Il semble que la viabilité cellulaire ne soit pas modifiée par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  dans les chondrocytes en culture (Lopez-Armada et al., 2006). Certains antioxydants semblent contrer l'effet de ces cytokines (Peristeris et al., 1992). En effet, il a été rapporté que le N-acétylcystéine (NAC) qui est un antioxydant favorise la survie cellulaire. Les caractéristiques de cet antioxydant seront illustrées dans la prochaine section.

### **1.5. LE N-acétylcystéine**

Le N-acétylcystéine est un antioxydant puissant capable de favoriser la survie cellulaire dans plusieurs types cellulaires (Shen et al., 1992;Ratan et al., 1994;Mayer and Noble, 1994). Les antioxydants comme le NAC permettent d'éliminer les radicaux libres

lors de l'augmentation du stress oxydatif. De plus, le NAC induit une augmentation de la concentration intracellulaire de glutathion réduit (GSH), le composé le plus important dans la protection de la cellule contre le stress oxydatif (Meister, 1988). L'efficacité du NAC à prévenir l'apoptose a généralement été démontrée dans un contexte où le stress oxydatif est impliqué (Ferrari et al., 1995).

## **1.6. LE STRESS OXYDATIF**

Dans des conditions normales, les chondrocytes vivent dans un environnement non vascularisé avec peu d'oxygène. Le métabolisme des chondrocytes est adapté à des conditions anaérobiques, mais certaines fonctions sont dépendantes de l'oxygène. L'oxygène nécessaire est principalement fourni par le liquide synovial. Dans des conditions pathologiques, la pression de l'oxygène peut fluctuer ce qui provoque une accélération du métabolisme des tissus ainsi qu'une contrainte anormale sur l'articulation. En réponse à des facteurs de stress oxydatif tels que la variation de la pression partielle de l'oxygène, le stress mécanique et les médiateurs inflammatoires, les chondrocytes produisent une quantité anormale de radicaux libres d'oxygène (ROS). Ces derniers seront abordés dans le prochain paragraphe.

### **- Les ROS**

Les ROS sont parmi les principales molécules qui sont impliquées dans la dégradation des composés de la matrice du cartilage. Les principaux ROS produits par les

chondrocytes sont le NO et l'anion superoxyde (Tiku et al., 1990; Fermor et al., 2001). Ils peuvent agir à différents niveaux lors du processus de dégradation du cartilage. En effet, ils peuvent inhiber la formation de la matrice et/ou induire la dégradation de la matrice extracellulaire par l'oxydation des constituants de la matrice ainsi que par l'expression d'enzymes qui dégradent la matrice, les MMPs. De plus, les ROS diminuent la phosphorylation oxydative de la mitochondrie et la formation de l'ATP dans les chondrocytes en culture. Ces deux mécanismes sont liés à une diminution de la synthèse du collagène et des protéoglycanes (Johnson et al., 2000). De plus, des études démontrent que les ROS peuvent oxyder les acides nucléiques, les facteurs de transcription, les phospholipides des membranes et les composantes intracellulaires et extracellulaires, ce qui a comme conséquence de conduire à la diminution des composantes de la matrice, à l'altération de l'activité biologique et à la mort des cellules (Lo et al., 1998; Henrotin et al., 2003; Tiku et al., 2003). L'augmentation des ROS pourrait, en partie, expliquer la dégradation de la matrice observée dans le cartilage OA. Dans la cellule, les ROS sont éliminés par des enzymes antioxydantes.

#### **- Système antioxydant**

Dans le cartilage, les chondrocytes utilisent un système d'enzymes antioxydantes pour prévenir la toxicité causée par les ROS. Ce système est formé de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion peroxydase (GPx). La SOD est une protéine qui transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène (Henrotin et al., 2005). La catalase et la GPx sont impliquées dans le recyclage du  $H_2O_2$  (Henrotin et al., 2005). La glutathion réductase (Gred) est elle aussi une enzyme

importante dans le système d'enzymes antioxydantes. Elle permet la régénération du glutathion oxydé (GSSG) en GSH.

#### - **La peroxydation lipidique**

Une des principales cibles des dommages oxydatifs causés par les ROS, est la membrane lipidique des cellules. En effet, les doubles liaisons contenues dans les lipides rendent la structure instable et plus propice aux attaques oxydatives (Lee et al., 2004). La peroxydation lipidique est une réaction consistant au clivage d'acide gras polyinsaturés soit l'acide arachidonique et l'acide linoléique via un mécanisme de réaction en chaîne (Uchida, 2003). L'hydroperoxyde lipidique est le principal produit découlant de la cette réaction en chaîne. Il sera à son tour décomposé en plusieurs produits dont des aldéhydes qui ont des actions dommageables variées (Uchida, 2003). Comparativement aux radicaux libres, les aldéhydes produits sont relativement stables et peuvent diffuser à l'intérieur de la cellule et se lier à des cibles loin de l'emplacement de leur origine (Uchida, 2003). Plusieurs produits finaux de la peroxydation lipidique sont obtenus suite de cette réaction toutefois, le 4-hydroxy-2nonéal (HNE) qui sera décrit dans le prochain paragraphe et le 4-hydroxyhexénal sont les aldéhydes les plus étudiés. Par leur stabilité et leur réactivité, ces aldéhydes sont impliqués dans plusieurs pathophysiologies associées au stress oxydatif (Lee et al., 2004).



## 1.7. LE HNE

### 1.7.1. Les propriétés du HNE

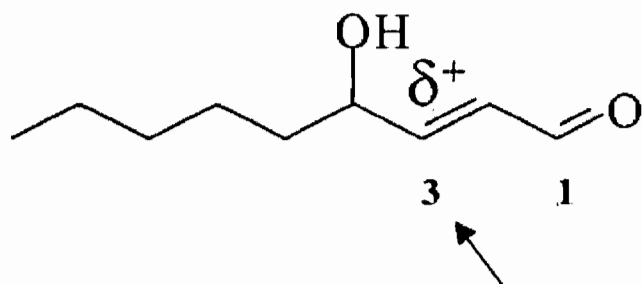
Les travaux fait par Esterbauer et ses collègues sur la production de molécules cytotoxiques lors de la peroxydation lipidique a permis de découvrir un groupe d'aldéhyde avec un potentiel de toxicité important (Schauenstein and Esterbauer, 1978;Benedetti et al., 1980). Parmi ces aldéhydes, le HNE est l'un des produits majoritaires et il est souvent utilisé comme marqueur de stress oxydatif. Les trois groupements fonctionnels qui composent cette molécule, soit un double lien carbone-carbone, un groupement carboxyl et un groupement hydroxyl confèrent au HNE des propriétés de haute réactivité (figure 7) (Leonarduzzi et al., 2004).

Le HNE peut réagir avec plusieurs cibles comme les protéines, les lipides et les nucléotides. La liaison avec ces molécules peut entraîner la dysfonction de ces molécules et par le fait même intervenir dans la signalisation cellulaire (Uchida and Kumagai, 2003;Awasthi et al., 2004;Leonarduzzi et al., 2004). L'interaction entre le HNE et les protéines se fait via la liaison au groupement sulfhydrique du résidu cystéine ou au groupement amino du résidu lysine et de l'histidine (Uchida and Kumagai, 2003).

Le caractère hautement toxique fait du HNE une molécule impliquée dans plusieurs maladies dégénératives comme l'Alzheimer, l'athérosclérose, les cataractes ainsi que le cancer (Uchida et al., 1994;Zarkovic et al., 1995;Awasthi et al., 1996;Sayre et al., 1997;Montine et al., 1997;Hammer et al., 1997;Yang et al., 2004). Le rôle du HNE dans le processus de signalisation reflète un grand intérêt pour la recherche car son effet

## Structure

### 4-hydroxy-2-nonenal



Site of primary nucleophilic attack

**Figure 7 :** Structure de la molécule du HNE montrant la double liaison  $\alpha$  et  $\beta$  (Schaur, 2003).

dépend de sa concentration. En effet, les études ont démontré que le HNE à faible concentration module la prolifération des cellules alors qu'à fortes concentrations, soit supérieur à 10  $\mu\text{M}$ , le HNE a des effets toxiques. Il peut affecter la signalisation cellulaire, causer la différenciation cellulaire et induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (Venn, 1978; Esterbauer et al., 1991; Barrera et al., 1991; Zarkovic et al., 1993; Kruman et al., 1997; Kreuzer et al., 1998; Ruef et al., 1998; Uchida et al., 1999; Dianzani et al., 1999; Cheng et al., 1999; Chiarpotto et al., 1999; Cheng et al., 2001a; Cheng et al., 2001b; Dianzani, 2003; Yang et al., 2003). La concentration de HNE produite *in vivo* peut atteindre 10  $\mu\text{M}$  à 5 mM en réponse au stress oxydatif (Kumagai et al., 2004). De plus, chez les personnes atteintes de maladies arthritiques sévères, la concentration de HNE, dans le sérum, est 3 à 10 fois plus élevée que dans celui des sujets normaux (Siems and Grune, 2003).

### 1.7.2. Le métabolisme du HNE

La majorité du HNE est métabolisé via sa conjugaison avec le GSH soit de manière spontanée ou via l'action de la glutathion-S-transférase (GST). Le produit formé pourra par la suite être métabolisé par l'acide mercapturique (Awasthi et al., 2004). Toutefois, une faible proportion du HNE peut être réduit en son alcool correspondant, le 1,4-hydroxy-2-nonène, par l'alcool déshydrogénase ou l'aldose réductase. Il peut aussi être oxydé en acide, l'acide 4-hydroxy-2-nonénoïque par l'aldéhyde déshydrogénase (Awasthi et al., 2004).

### 1.7.3. Le HNE et L'OA

Les études portant sur le rôle du HNE dans l'OA sont peu nombreuses. Il a été démontré précédemment par notre laboratoire que le niveau des complexes HNE/protéines sont augmentés significativement dans le liquide synovial de patients OA comparativement aux sujets normaux. De plus, le HNE induit la dégradation du cartilage dans des explants de cartilage par la libération d'hydroxyproline et la formation de néoépitopes de collagène type II (COLL II). Les complexes HNE/COLL II ont une susceptibilité plus élevée à la dégradation par la MMP-13 active comparativement au COLL II natif. Au niveau transcriptionnel, le HNE inhibe la synthèse du COLL II et de l'inhibiteur tissulaire de la MMP-1 (TIMP-1), toutefois, il induit la synthèse de la MMP-13 via l'activation de la voie de la p38 MAPK (Morquette et al., 2006).

Dans une seconde étude, nous avons démontré que le HNE joue un rôle central dans la régulation de la COX-2 et de l'iNOS dans les chondrocytes OA. En effet, le HNE induit une augmentation du niveau protéique et de l'ARNm de la COX-2 ainsi qu'une augmentation de la PGE-2 via l'activation du site de liaison ATF/CRE au niveau du promoteur de la COX-2. Toutefois, il n'a aucun effet sur le niveau basal de l'expression de l'iNOS et du NO. De plus, il prévient l'induction de l'iNOS et la production du NO induit par l'IL-1 $\beta$ . Il agit possiblement par l'inhibition de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  par sa liaison avec I $\kappa$ B kinase alpha. Il en résulte l'inhibition de la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau.

#### 1.7.4. Le HNE et l'apoptose

Il a été précédemment démontré que le HNE peut induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires. En effet, le HNE conduit à l'apoptose par ses effets sur c-Jun N-terminal protéine kinase (JNK) et sur la caspase-3 (Cheng et al., 2001b). Il induit l'apoptose par le relâchement du cytochrome *c*, l'activation de la PARP et la fragmentation de l'ADN (Raza and John, 2006). Cette apoptose est couplée à une augmentation de Bax et à une diminution de Bcl-2 (Lee et al., 2004). Dans les cellules PC12, il a été démontré que le HNE augmente le stress oxydatif induisant ainsi une augmentation de l'expression de la GSTA4-A, du Cytochrome P450 2E1 et de la HSP70 (Raza and John, 2006). Dans la lignée cellulaire YPEN-1, le HNE induit la mort cellulaire. Toutefois, cet effet est contré en présence d'antioxydant, le NAC.

## OBJECTIF GÉNÉRAL

Cette étude a pour but d'identifier de nouvelles molécules susceptibles d'être impliquées dans le phénomène apoptotique observé chez les chondrocytes OA. De nombreuses études rapportent la contribution du stress oxydatif dans la pathologie de l'OA. Ainsi, le NO, qui est un ROS, semble contribuer au phénomène apoptotique dans l'OA. Dans ce projet, nous proposons d'étudier l'implication du HNE comme molécule susceptible d'induire l'apoptose dans les chondrocytes OA. Le HNE est décrit comme étant l'aldéhyde le plus cytotoxique et génotoxique produit lors de la peroxydation lipidique. De plus, il a précédemment été démontré qu'il est un inducteur de l'apoptose dans plusieurs types cellulaires. Son niveau élevé dans le plasma et dans la membrane synoviale des patients atteints de l'OA indique son possible rôle dans la modulation de l'apoptose dans cette maladie. Par ailleurs, dans le cartilage OA, le HNE a des effets cataboliques et inflammatoires via l'inhibition de la synthèse de la COLL II et de TIMP-1, et l'induction de la synthèse de la MMP-13 et de la COX-2. Dans cette étude, nous proposons d'investiguer le rôle du HNE dans l'activation des caspases (-3, -8 et -9). De plus, nous proposons de déterminer son effet sur la mitochondrie en mesurant la libération des facteurs apoptotiques contenu dans cet organelle (cytochrome *c* et l'AIF) ainsi que sur le noyau par la mesure de la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine. Par la suite, l'effet du HNE sur l'état rédox sera étudié en mesurant le ratio GSSG/[GSH+GSSG]. Finalement, le rôle de la GST-A4 dans la protection des chondrocytes OA contre la cytotoxicité du HNE sera étudiée.

## HYPOTHÈSES

De récentes études ont montré que le HNE semble être impliqué dans plusieurs maladies par sa capacité à induire l'apoptose de différents types cellulaires. Cependant, sa capacité à induire l'apoptose dans les chondrocytes OA humains n'a pas été déterminée.

Chez les patients atteints de l'OA, la concentration du HNE dans le liquide synovial est augmentée comparativement aux sujets normaux. En se basant sur la littérature, nous avons fondé l'hypothèse que le HNE, à cause de son potentiel toxique, pourrait jouer un rôle dans la pathophysiologie de l'OA humaine par l'induction de l'apoptose dans les chondrocytes OA. En effet, nous croyons que le HNE induira l'activation de la voie apoptotique intrinsèque et extrinsèque. L'activation de la voie intrinsèque se traduira par l'activation du récepteur Fas et l'induction du clivage de la caspase-8 et que l'activation de la voie intrinsèque résultera en la libération du cytochrome *c* et en l'activation de la caspase-9. L'activité des deux précédentes enzymes conduira à l'activation d'une troisième enzyme, la caspase-3. D'autre part, notre hypothèse se base aussi sur la capacité du HNE à induire la fragmentation de l'ADN, son effet sur les facteurs Bax et Bcl-2, sa capacité à induire la libération des facteurs pro-apoptotiques (cytochrome *c* et AIF) et son effet sur l'altération de l'état rédox intracellulaire.

# **CHAPITRE II :**

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**



## 2.1 Préparation des spécimens

Le chondrocytes OA utilisés dans cette étude sont issus du cartilage de patients atteints d'arthrose qui ont subi un remplacement total du genou ( $69 \pm 9$  ans, moyenne  $\pm$  SEM âge). Le diagnostic des patients a été établi en accord avec les critères de l'«American College of Rheumatology» (Altman et al., 1986). Au moment de l'intervention, les patients présentaient les symptômes nécessitent un traitement au NSAIDs ou les inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Le protocole d'étude impliquant l'utilisation des spécimens humains a été approuvé par le comité d'éthique au centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Brièvement, de fines lamelles de cartilage recouvrant l'os, obtenues dans des conditions stériles, seront retirées puis coupées en petits cubes, ceux-ci seront lavés à trois reprises avec du tampon phosphate salin (PBS) contenant des antibiotiques (500 U/mL pénicilline, 500  $\mu$ g/mL de streptomycine ; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Une fois les lavages terminés, le cartilage baignant dans le PBS supplémenté avec des antibiotiques sera incubé à température pièce pendant 1 heure afin d'être décontaminé.

## 2.2 Isolation des chondrocytes

Toutes les manipulations ont été faites en milieux stériles

Une fois les étapes de préparation du cartilage terminées, les chondrocytes seront isolés du cartilage par une digestion enzymatique séquentielle. Brièvement, les explants du cartilage ont été digéré par une première enzyme, la pronase à 1 mg/mL (Sigma-Aldrich Canada, Oakvill, Ontario, Canada) pendant une heure à 37°C suivie par une

seconde enzyme, la collagénase à 1 mg/mL (Sigma-Aldrich) pour une période d'incubation de 16 heures toujours à 37°C. Les deux enzymes ont été préparées dans du *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM; Gibco BRL) contenant 10% de Sérum bovin foetal (FBS; HyClone, Logan, Utah, USA) et des antibiotiques (100 U/mL pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine). Après ces étapes, le produit de la digestion a été filtré à l'aide d'un filtre de 70 µm (BD Falcon, Bedford, MA, USA) et centrifugés à 1 500 rpm durant 10 minutes. Après avoir retiré le surnageant, le culot, composé de chondrocytes, a été resuspendu dans du milieu de culture DMEM/10% FBS contenant les antibiotiques.

### **2.3 Culture cellulaire**

Les cellules isolées seront mises en culture dans des flasques de 175 cm<sup>2</sup>. Les chondrocytes en culture ont été maintenus à 37°C dans un environnement contenant 5% de CO<sub>2</sub> et le milieu de culture a été changé périodiquement (Mosmann, 1983). À confluence, les chondrocytes ont été détachés à l'aide d'un traitement à la trypsine (0.025% EDTA/0,01% trypsine, Gibco BRL) et mis en culture dans des plaques de 6, 12, 24 ou 96 puits, selon l'expérience, avec une haute densité cellulaire. Afin de préserver le phénotype des cellules, seul les chondrocytes de premier passage ont été utilisés.

### **2.4 Test de viabilité**

L'une des premières étapes de cette étude est de mesurer l'effet cytotoxique du HNE sur la viabilité des chondrocytes OA. L'analyse de la viabilité cellulaire est évaluée

par l'utilisation du (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (MTT; Sigma). Cette méthode, développée par Mosmann et col. et modifiée par Denizot et col, permet de mesurer l'activité de la fonction déshydrogénase de la mitochondrie (Mosmann, 1983;Denizot and Lang, 1986;Twentyman and Luscombe, 1987;Awasthi et al., 2004). Le MTT est un composé tétrazolium d'une couleur jaune qui sera réduit en formazan bleu par les déshydrogénases mitochondriales. Ces enzymes sont présentes uniquement dans les cellules vivantes et qui sont métaboliquement actives (Altman, 1976). Bien que la viabilité puisse être évaluée par cette méthode, elle ne permet pas de faire la distinction entre la mort des cellules par nécrose ou par apoptose (McKeague et al., 2003).

Afin d'évaluer la viabilité cellulaire des chondrocytes, ces derniers ont été ensemencés dans des plaques de 96 puits à raison de  $5 \times 10^4$  cellules par puits dans du DMEM/10% FBS. Quarante-huit heures plus tard, soit avant la stimulation, le milieu a été remplacé par du milieu frais DMEM/2% FBS. Les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes de HNE (0, 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ ) pendant différents temps d'incubation (2, 4, 6, 8, 16 et 24 heures). Afin d'étudier la prévention de l'effet cytotoxique du HNE, les cellules ont été pré-incubées pendant 1 à 2 heures avec les produits suivants :

- 1) un antioxydant, le NAC à 200  $\mu\text{M}$
- 2) Un inhibiteur de PARP-1 le 5-iodo-6-amino-1,2-benzopyrone (l'INH<sub>2</sub>BP, Sigma) à 50 et 100  $\mu\text{M}$
- 3) Anti-fas (20  $\mu\text{g/ml}$ )

À la fin de chaque incubation, les cellules ont été incubées pendant 15 min à 37°C dans du DMEM/2% FBS contenant 0.5 mg de MTT/mL. Une fois le temps écoulé, le milieu contenant le MTT a été remplacé par 200 µL d'une solution de solubilisation acide composée de 0.04 M HCl-isopropanol et laissé pour une période de 5-10 minutes à température de la pièce. Enfin, l'isopropanol acide a été transféré dans des plaques de 96 puits puis lues à 570 nm à l'aide d'un lecteur universel de microplaques EL800 (Bio Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). Les résultats seront exprimés en pourcentage du contrôle qui a une valeur arbitraire de 100%.

## **2.5 Dosage de l'activité de la caspase-3, -8 et -9**

Le niveau de l'activité de caspase-3, -8, et -9 a été mesuré à l'aide des trousse spécifiques qui permettent de mesurer l'activité protéasique de chacune de ces caspases par l'ajout d'un peptide spécifique, le DEVD, l'IETD et le LEHD respectivement couplé à un chromophore, le p-nitroaniline. Le chromophore libéré pourra être quantifié à 405 nm. L'activité de ces enzymes sera directement proportionnelle à l'absorbance obtenue. Les expériences ont été faites selon les protocoles fournis avec les trousse. Brièvement, les chondrocytesensemencés dans des plaques de 6 puits à haute confluence ont été incubés dans du DMEM/2% FBS avec 30 µM de HNE durant différents temps (0, 2, 4, 6 et 16 h).

Pour la caspase-8 et -9, l'activité enzymatique a été évaluée à l'aide d'une trousse achetée chez R&D. Brièvement, les cellules ont été lysées, à la fin de l'incubation, avec

un tampon de lyse pendant 10 minutes sur la glace pour obtenir une concentration finale de 2 - 4 mg de protéines/mL. Suite à cette étape, le lysat a été centrifugé 1 minute à 10,000 x g et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. Dans des plaques de 96 puits, 100 – 200 µg de protéines, 50 µl du tampon de réaction 2X contenant 1% de DTT et 5 µl de substrat colorimétrique (IETD-pNA ou LEHD-pNA) ont été ajoutés à chacun des puits.

Pour la caspase-3, l'activité enzymatique a été évaluée à l'aide d'un kit acheté chez Sigma. Pour ce faire, les cellules ont été lysées avec un tampon de lyse (50 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT) à une concentration de  $10^7$  cellules par 100 µL de tampon, durant 15 minutes sur la glace. Subséquemment, le lysat a été centrifugé à 16 000 x g pendant 15 minutes. Dans des plaques de 96 puits, 5 µL de surnageant ont été ajoutés suivis par l'ajout du substrat (Ac-DEVD-pNA, 200 µM). Finalement le volume a été complété à 100 µL avec du tampon d'incubation (20 mM HEPES, pH 7,4, 2 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT).

Les plaques ont été incubées durant 16 heures à 37°C pour permettre la réaction, puis l'absorbance a été lue à 405 nm.

## **2.6 Dosage de Bcl-2**

Le dosage de Bcl-2 a été effectué dans l'extrait cellulaire des chondrocytes à l'aide d'une trousse commerciale (Calbiochem, San Diego, California, USA) suivant les instructions du manufacturier. Brièvement, les chondrocytes OA ont été incubés en

présence ou en absence de 30  $\mu\text{M}$  HNE pour des temps variant entre 0 et 16 heures. À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées avec le PBS, décollées délicatement et recueillies dans des tubes de 1,5 mL. Le culot sera resuspendu dans du tampon (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatin et 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin ajusté à pH 7,4) pour obtenir une concentration finale de  $5 \times 10^6$  cellules/ml. Par la suite, 20  $\mu\text{L}$  de l'*antigen Extraction Agent* (AEA) sont ajoutés par 100  $\mu\text{L}$  d'extrait cellulaire. Après une incubation de 30 minutes sur la glace avec d'occasionnelles agitations au vortex, les homogénats sont centrifugés 5 minutes à 10 000 x g. Dans chaque puits préalablement enrobé avec un anticorps anti-Bcl-2, 50  $\mu\text{L}$  d'anticorps de détection (*FITC-conjugated monoclonal anti-human Bcl-2*) et 50  $\mu\text{L}$  d'échantillon ou de standard (200, 80, 32, 12,8, 5.12, et 0 U/mL) ont été ajoutés. Après 2 heures d'incubation à température pièce, les puits ont été lavés à trois reprises avec le tampon de lavage puis 100  $\mu\text{L}$  de l'anticorps anti-FITC conjugué à la peroxydase diluée 1:200 ont été ajoutés. Après 30 minutes d'incubation à température pièce, la plaque a été lavée à nouveau avec le tampon de lavage, puis 100  $\mu\text{L}$  de substrat ont été rajoutés dans chaque puits. À la fin, la réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 100  $\mu\text{L}$  de l'acide sulfurique 2.5 N puis l'absorbance a été lue à 450 nm.

## **2.7 Mesure qualitative et quantitative de la fragmentation de l'ADN.**

La fragmentation d'ADN a été mise en évidence à l'aide d'une trousse (Suicide-Track™ DNA Ladder isolation kit; Calbiochem) qui permet la détection des fragments d'ADN. L'isolation a été réalisée selon le protocole fournit avec la trousse. En résumé,

les cellules ( $2 \times 10^6$ ) traitées avec  $30 \mu\text{M}$  HNE en présence ou en absence de  $200 \mu\text{M}$  NAC ont été lysées dans  $55 \mu\text{l}$  de tampon de lyse qui inactive les nucléases. Puis,  $20 \mu\text{L}$  de la solution contenant de l'ARNase ont été ajoutés. Après une incubation d'une heure à  $37^\circ\text{C}$ , un volume de  $25 \mu\text{L}$  de la solution contenant de la protéine K a été ajouté au lysat cellulaire. Les cellules ont été incubées à  $55^\circ\text{C}$  pendant 16 heures. Suite à cette incubation,  $500 \mu\text{L}$  de tampon de resuspension ( $10 \text{ mM}$  Tris pH 7.5,  $1 \text{ mM}$  EDTA) ont été ajoutés. L'ADN a été précipité par l'ajout de  $2 \mu\text{L}$  de Pellet Paint® Co-Precipitant,  $60 \mu\text{l}$  de  $3 \text{ M}$  Acétate de sodium pH 5.2 et de  $662 \mu\text{L}$  de 2-Propanol. Les tubes ont été agités par inversion, incubés à température pièce pendant 2 minutes et centrifugés à  $16\,000 \times g$  pendant 15 minutes. Le surnageant a été retiré, le culot contenant l'ADN a été rincé avec  $500 \mu\text{L}$  d'éthanol 70% et centrifugé de nouveau. Le culot a été à nouveau lavé mais cette fois avec de l'éthanol 100% et centrifugé. Une fois le surnageant retiré, le culot a été séché puis resuspendu dans  $50 \mu\text{l}$  de tampon de suspension. Sur un gel de 1,5% d'agarose préparé dans du tampon TAE ( $40 \text{ mM}$  Tris-base,  $25 \text{ mM}$  EDTA,  $20 \text{ mM}$  acide acétique), un volume de  $25 \mu\text{l}$  ( $21 \mu\text{l}$  d'échantillon auquel  $4 \mu\text{l}$  de tampon gel loading 6X ont été ajoutés) a été déposé par puits. Les fragments ont migré dans du tampon TAE à 60 volts pendant 45 minutes. Les fragments d'ADN ont été détectés par l'incubation du gel d'agarose dans une solution de bromure d'éthidium ( $0,5 \mu\text{g/ml}$  de tampon TAE) suivi par un lavage de 30 minutes dans de l'eau distillée. Les fragments d'ADN ont été visualisés à l'U.V puis analysés à l'aide d'un système d'analyse d'images (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad).

La quantification des fragments d'ADN a été effectuée via le dosage des nucléosomes (histones + l'ADN) à l'aide d'une trousse commerciale (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> ; Roche) en suivant les instructions du manufacturier. Pour ce faire, les chondrocytes OA ont été traités pendant 4 heures avec des concentrations croissantes de HNE (0 à 30  $\mu$ M) ou avec 200  $\mu$ M NAC en présence ou en absence de 30  $\mu$ M de HNE. À la fin de l'incubation, les cellules ont été lysées pendant 30 minutes à température pièce dans le tampon de lyse. Le lysat a été centrifugé 10 min à 200 x g. Le surnageant (20  $\mu$ L), contenant les nucléosomes, de chacune des conditions a été déposé dans une plaque de 96 puits préalablement enrobés avec un anticorps anti-histone. Par la suite, 80  $\mu$ l d'immunoréactif, (anti-histone-biotin et anti-DNA-POD) ont été ajoutés à chacun des puits. La plaque a été incubée 2 heures à température pièce sous agitation (300 rpm). À la fin de l'incubation, la plaque a été lavée à trois reprises avec le tampon d'incubation puis 100  $\mu$ l de substrat ABTS ont été ajoutés. Après 10 à 20 minutes, la réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 100  $\mu$ l de l'acide sulfurique 2.5 N. L'absorbance a été lue à 405 nm.

## 2.8 Cytochrome *c*

La présence du cytochrome *c* dans le cytoplasme a pu être mesurée à l'aide d'une trousse (Calbiochem). L'essai a été réalisé selon la procédure fournie avec la trousse avec des modifications. Brièvement, les cellules ont été prétraitées avec et sans 200  $\mu$ M NAC durant 1 heure puis stimulées avec une concentration croissante de HNE (0 à 30  $\mu$ M) pendant 4 heures. Pour isoler la fraction cytosolique, les cellules ont été resuspendues dans un tampon d'isolation de mitochondrie (manitol 220 mM, sucrose 70 mM, HEPES



KOH 10mM, pH 7.4, EDTA 10 mM, glycérol 10%) à raison de  $1,5 \times 10^6$  cellules/ml de tampon. Les cellules ont été passées délicatement à plusieurs reprises dans une seringue à aiguille calibre 25 x 5/8 po puis laissées dans la glace pendant 15 min. Le lysat a été centrifugé à  $10\,000 \times g$  pendant 15 minutes à 4°C puis le surnageant a été recueilli. Dans une plaque de 96 puits préalablement enrobés avec un anticorps anti-cytochrome *c* humain, 100 µl de diluant ainsi que 100 µl d'échantillons ou de standard ont été ajoutés à chacun des puits. Après une incubation de 2 heures à température pièce, la plaque a été lavée à trois reprises avec le tampon de lavage, puis 200 µl de l'anticorps anti-cytochrome *c* conjugué ont été ajoutés pour une période de 2 heures à température pièce. Après des lavages comme précédemment décrit, 200 µl de substrat ont été ajoutés à l'abri de la lumière puis la plaque a été incubée pendant 30 minutes. Finalement, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 50 µl d'acide sulfurique 2.5 N puis l'absorbance est lue à 450 nm.

## 2.9 Immunobuvardage de type Western

Les chondrocytes OA ( $10^6$  cellules/puits) ont été incubés pendant 16 heures avec des concentrations croissantes de HNE (0 à 30 µM) ou avec 30 µM HNE à différents temps d'incubation (0 à 16 heures). Un prétraitement avec 200 µM NAC pendant 1 heure a été effectué en présence ou en absence de 30 µM HNE. Pour déterminer l'expression des caspases, de Bax, de PARP et de Fas, les cellules ont été lysées à la fin de l'incubation dans du tampon d'électrophorèse (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 2%SDS, 5% β-Mercaptoéthanol, 0,025% bleu de bromophénol).

Pour déterminer le niveau protéique de l'AIF transloqué dans le noyau, les cellules ont été lavées au PBS froid puis 400  $\mu$ L de tampon de lyse (10 mM HEPES, pH7.9, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 1% NP-40) ont été ajoutés aux puits. Les cellules ont été recueillies puis centrifugées 30 secondes à 3000 rpm et à 4°C. Le culot contenant des noyaux a été suspendu dans du tampon de lyse contenant 20 mM pH 7.9 HEPES, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM EDTA puis centrifugé 10 minutes à 10 000 rpm. Le surnageant contenant les protéines nucléaires a été recueilli et leur concentration déterminée en utilisant la méthode de l'acide bicinchoninique (Pierce).

Les échantillons (~20  $\mu$ g de protéines) ont été dénaturés dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes, déposés sur un gel discontinu de polyacrylamide (4-12%) en présence de 0.1% de sodium dodécyl sulfate (SDS) puis transférés sur des membranes de nitrocellulose (BioRad) dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol). Les membranes ont été bloquées pendant 16 heures dans une solution de blocage contenant 5% (p/v) de lait en poudre dissout dans le tampon TTBS (20 mM Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% Tween-20). Par la suite, les anticorps primaires ont été ajoutés aux membranes pendant 24 heures à 4°C puis lavés 3 fois pendant 10 min pour chaque lavage. Les anticorps primaires utilisés sont : anticorps polyclonal de lapin anti-AIF, anticorps polyclonal de lapin anti-PARP, anticorps polyclonal de lapin anti-Bax, anticorps polyclonal de lapin anti-caspase-3, -9 (Calbiochem), anticorps polyclonal de lapin anti-caspase-8 (Santa Cruz) et anticorps monoclonal de souris anti-Fas (Upstate, Lake Placid, NY, USA) à une dilution de 1:200, 1:2000, 1:500, 1:2000, 1:500, 1:200 et 1:500 respectivement. Les membranes ont été par la suite incubées avec l'anticorps anti-

lapin IgG ou anti-souris IgG couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvanie, USA) à une dilution de 1:20 000. La révélation des protéines immunoréactives a été réalisée à l'aide d'un mélange équivalent de deux solutions commerciales de chemiluminescence intensifiée (LumiGLO Chemilumine Substrat cell Signaling technologic). Les bandes ont été visualisées par exposition de la membrane à un film de Kodak X-Omat (Eastman Kodak Ltd, Rochester, New-York, USA). Le poids moléculaire a été établi à partir du standard de poids moléculaire.

### **2.10 Dosage du GSH**

Le dosage du GSH total et oxydé a été effectué dans les extraits totaux des chondrocytes OA en utilisant une trousse commerciale de Cayman Chemical suivant les instructions du fabricant. Le principe de ce dosage est basé sur la réaction des groupements sulphydriques du GSH avec l'acide 5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB) en produisant un produit final jaune, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB). Le conjugué GSTNB sera à son tour réduit en GSH et TNB en présence de la GRed. Le taux du TNB produit sera proportionnel au taux du GSH recyclé. La présence de la GRed permet aussi à la réduction du GSSG en 2 GSH ce qui nous permet grâce à ce kit de mesurer la totalité du GSH (réduit + oxydé). Cette trousse permet aussi de mesurer exclusivement le niveau du GSSG après avoir traité les échantillons avec du 2-vinylpyrimidine.

Brièvement, les chondrocytes OA ( $2 \times 10^6$  cellules) ont été incubés dans du DMEM/2% FBS en présence de 30 mM HNE à différents temps d'incubation (0, 2, 4, 8, 16 h), récupérés par grattage dans du PBS froid puis centrifugés à 800 x g pendant 5 min.

Le culot est homogénéisé puis soniqué dans du tampon MES contenant 0.4 M 2-(N-morpholino) acide éthanesulphonique, 0.1 M phosphate et 2 mM EDTA. Après une centrifugation à 10 000 x g pendant 15 min, le surnageant est récupéré puis déprotéinisé à l'aide d'un traitement avec l'acide métaphosphorique tel que décrit dans le protocole du manufacturier. La déprotéinisation des échantillons prévient la réaction des groupements sulphydriles des protéines avec le réactif DTNB. 50 µL du standard (GSSG) ou de chaque échantillon et 150 µL du cocktail réactionnel sont placés dans une plaque de 96 puits. La lecture se fait à une longueur d'onde de 405 nm en utilisant un lecteur de plaque à chaque 5 min d'intervalle pendant 30 min. Les résultats sont calculés en µM de GSH ou de GSSG /mg protéines puis présentés en ratio GSSG/[GSSG+GSH]

### **2.11 Transfection des chondrocytes avec GST-A4**

Les chondrocytes transformés SW1353 ont été repartis dans des plaques de 24 puits à raison de  $2 \times 10^5$  cellules /puits 16 h avant la procédure. Par la suite, le milieu de culture a été changé puis les cellules ont été transfectées avec 1 ng des vecteurs d'expression de la GST-A4 sauvage ou muté en utilisant le Lipofectamine (invitrogen life technology) en suivant les instructions du fournisseur. Les deux plasmides ont été généreusement offerts par Dr Awasthi (Université de Texas, États-Unis). Après 6 h d'incubation, les milieux ont été changés avec un milieu DMEM contenant 2% FBS puis les cellules ont été laissées en culture durant 16 h avant d'être traitées avec 30 µM HNE pour une autre période de 16 h. À la fin de l'incubation, la viabilité cellulaire des chondrocytes a été mesurée par le test MTT tel que décrit précédemment et le niveau d'expression de la GST-A4 a été déterminé par immunobuvardage de type Western en

utilisant des anticorps spécifiques anti-GST-A4 (Abnova) tel que décrit précédemment dans le paragraphe 2.9.

## **2.12 Analyses statistiques**

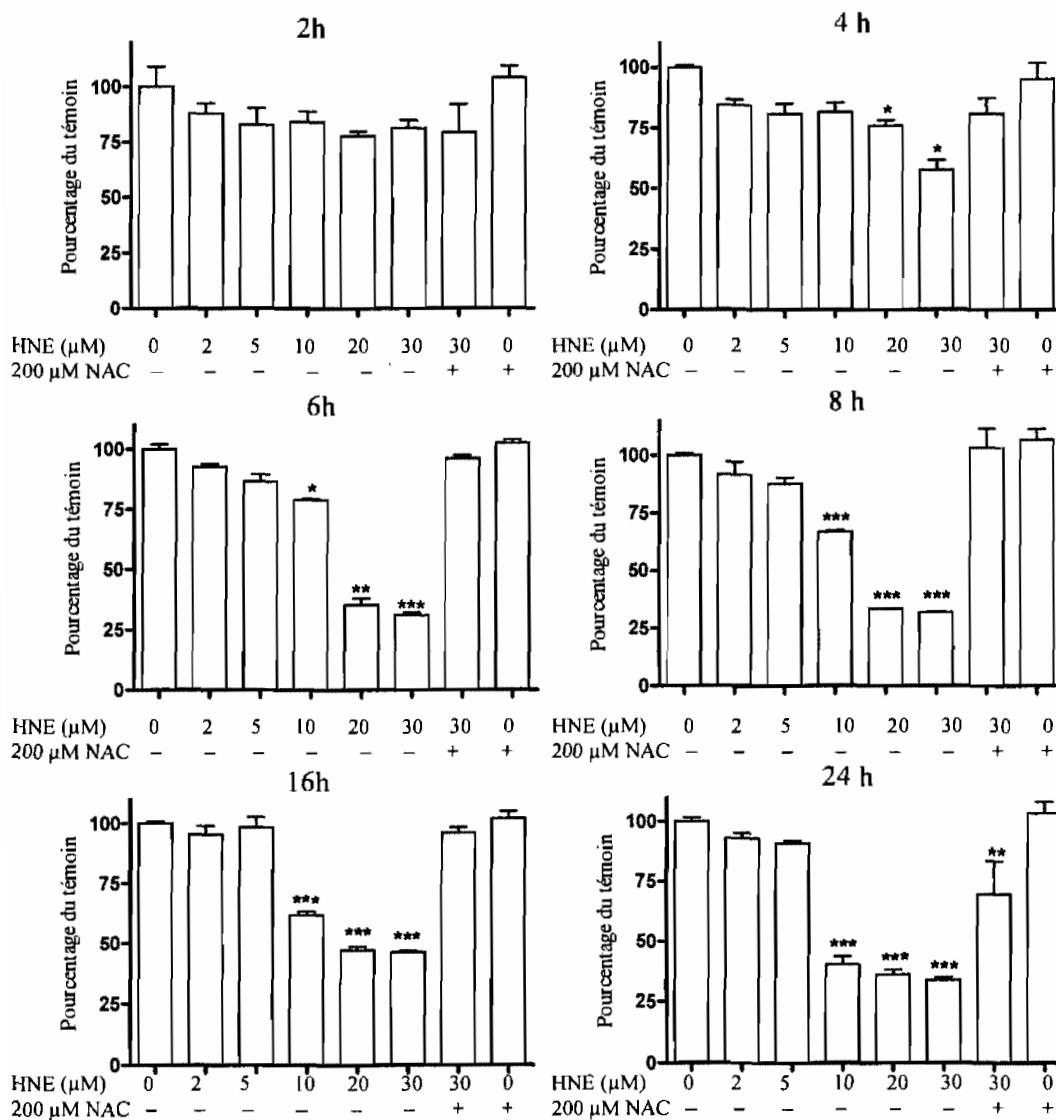
Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard). La signification statistique des différences entre les valeurs moyennes est ensuite évaluée par le test *t* de Student's. Les résultats sont considérés statistiquement significatifs lorsque  $P < 0.05$ .

# **CHAPITRE III : RÉSULTATS**

### 3.1 Effet du HNE sur la viabilité des chondrocytes OA

Il a été démontré que le HNE diminue la viabilité de plusieurs types cellulaires. Dans la présente étude, l'effet du HNE sur la viabilité cellulaire des chondrocytes, mesurée par la méthode du MTT, a été évalué en incubant les cellules à différents temps d'incubation (2, 4, 6, 8, 16 et 24 h) en présence des concentrations croissantes du HNE (0, 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ ). Tel que présenté à la figure 8, le HNE diminue la viabilité cellulaire de façon temps et dose dépendants. Les résultats montrent que parmi les concentrations de HNE utilisées, soit 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ , uniquement les trois concentrations les plus élevées, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ , diminuent significativement la viabilité. À ces trois concentrations, les résultats obtenus ne montrent aucune diminution après 2h d'incubation. Toutefois, il y a une diminution significative suite à 4 h de traitement avec 20 et 30  $\mu\text{M}$  de HNE soit une diminution de 24 et 42% respectivement. Il y a une diminution de la viabilité suite à 6 h de 21, 64 et 68%, à 8 h de 33, 67 et 68%, à 16 h de 38, 53 et 54% et à 24 h de 60, 64 et 66% lorsque les chondrocytes OA sont traités avec 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$  de HNE respectivement.

De plus, les résultats montrent que lorsque le traitement des chondrocytes avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE est précédé par une pré-incubation durant une heure avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC, il n'y a plus de diminution significative de la viabilité comparativement aux cellules non-traitées avec le NAC et ce pour les six différents temps d'incubation.



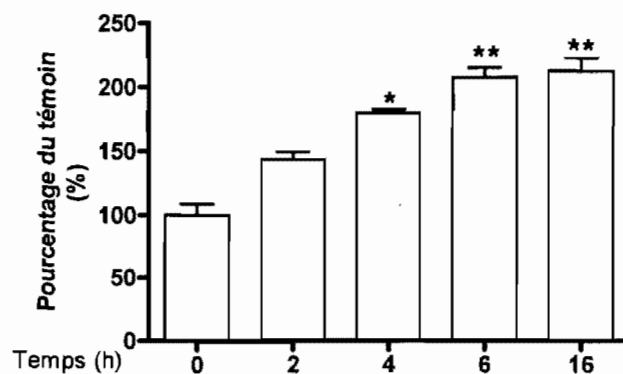
**Figure 8 :** Effet du HNE sur la viabilité des chondrocytes humains OA et en présence du NAC comme agent protecteur. Les cellules ont été traitées avec le HNE (0 à 30 μM) à différentes périodes d'incubation (0, 2, 4, 6, 8, 16 et 24 h). L'effet protecteur de NAC a été évalué par la préincubation des cellules avec 200 μM NAC puis incubées une nouvelle fois avec 30 μM de HNE durant les temps indiqués ci-dessus. La viabilité a été mesurée par la méthode du MTT et l'absorbance a été lue à 570 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin ± SEM, n=3. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



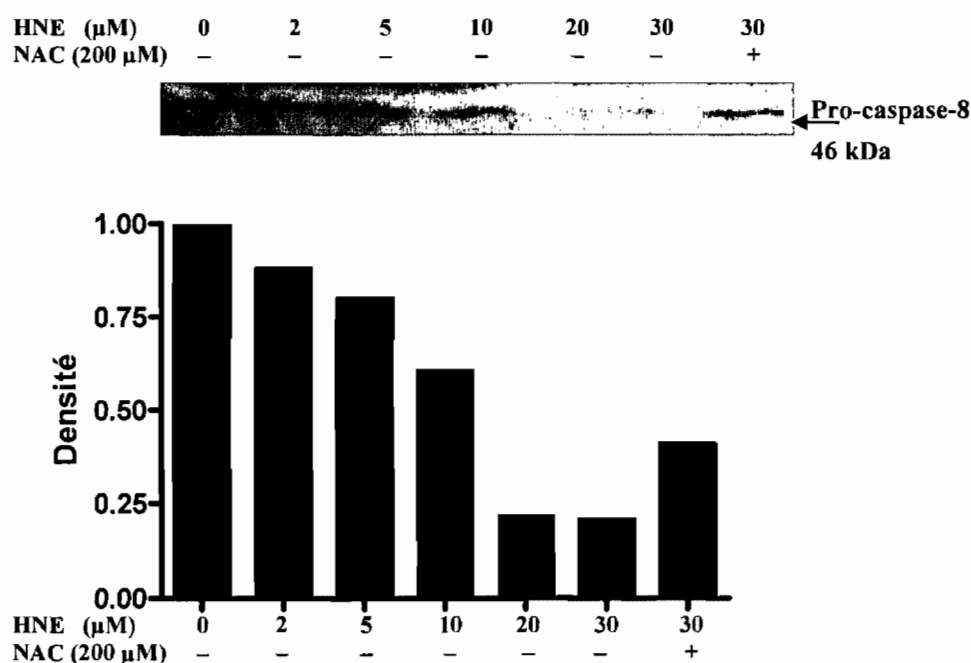
### **3.2 Dosage de l'activité enzymatique et du niveau protéique de la caspase-8**

La caspase-8 est une pro-enzyme qui a un rôle initiateur dans l'apoptose. Son clivage va conduire à l'activation de la caspase-3 soit directement ou indirectement. L'activation de la caspase-8 par le HNE a été étudiée par la mesure i) de l'activité de la caspase-8 et ii) du niveau protéique de la pro-caspase-8. Pour la première partie, les résultats du dosage de l'activité de la caspase-8, mesurée à l'aide d'une trousse commerciale, indiquent une augmentation significative de l'activité en fonction du temps lorsque les chondrocytes humain OA sont traités avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE (figure 9A). Comparativement au témoin, le HNE à cette concentration augmente l'activité de la caspase-8 à 143, 180, 208 et 213% lorsque les cellules sont incubées durant 2, 4, 6, et 16 h respectivement. Pour la deuxième partie, les résultats obtenus par immunobuvardage de type Western (figure 9B) montrent une diminution importante de la pro-forme de la caspase-8 suite à une incubation de 16 h en présence de 20 et 30  $\mu\text{M}$  de HNE. Toutefois, le clivage de la caspase-8 est partiellement prévenu par le prétraitement des cellules durant 1 h avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC.

A



B

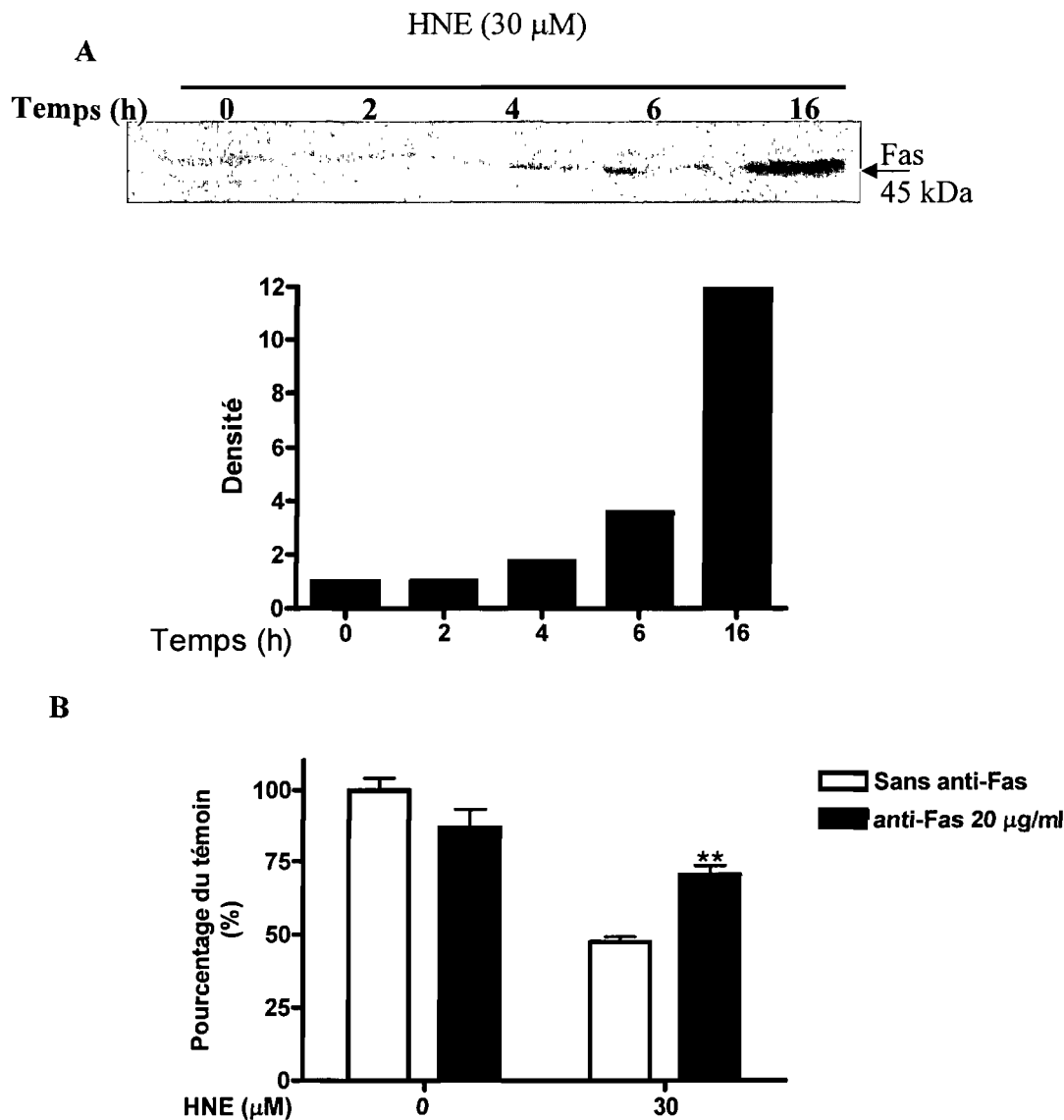


**Figure 9 :** Effet du HNE sur l'activité enzymatique et sur le niveau protéique de la caspase-8. **(A)** L'activité de la caspase-8 a été mesurée selon le protocole fourni avec la trousse utilisée. Les chondrocytes humains OA ont été stimulés avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE pendant 0, 2, 4, 6 et 16 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . **(B)** L'expression protéique a été réalisée par immunobuvardage de type Western sur l'extrait total de chondrocytes OA stimulés durant 16 h avec différentes concentrations de HNE (0, 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ ) avec ou sans prétraitement avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC durant 1 h.

### 3.3 Effet du HNE sur le récepteur Fas

Le récepteur Fas fait partie des récepteurs impliqués dans l'induction de la voie apoptotique extrinsèque. En effet, son activation conduira au clivage de la pro-caspase-8. L'effet du HNE sur ce récepteur a été étudié en deux volets, le premier était de mesurer le niveau protéique de ce récepteur et le second de déterminer l'effet de la neutralisation du récepteur Fas en utilisant un anticorps anti-Fas sur la viabilité cellulaire. Dans le premier volet, les cellules ont été traitées avec une concentration fixe de HNE (30  $\mu$ M) durant différents temps d'incubation soit (0, 2, 4, 6 et 16 h). L'expression protéique, réalisée par immunobuvardage de type Western (figure 10A), montre une augmentation progressive du niveau protéique de Fas après 4, 6 et 16 h d'incubation où l'intensité maximale est atteinte. Toutefois aucune variation n'est observée après 2 h d'incubation.

Dans la seconde partie, les cellules ont été pré-incubées 1 h avec 20  $\mu$ g/ml d'anticorps anti-Fas puis stimulées durant 4 h avec ou sans 30  $\mu$ M de HNE. Les résultats présentés à la figure 10B, montrent que la viabilité, déterminée par la méthode du MTT, est diminuée d'environ 13% chez les chondrocytes OA traités avec l'anticorps anti-Fas comparativement aux cellules non traitées. Toutefois, lorsque les cellules sont traitées avec 30  $\mu$ M de HNE, le prétraitement des cellules avec anticorps anti-Fas permet d'augmenter significativement leur viabilité passant de 42% avec le HNE seul à 64% lorsque les cellules sont prétraitées avec anticorps l'anti-Fas.

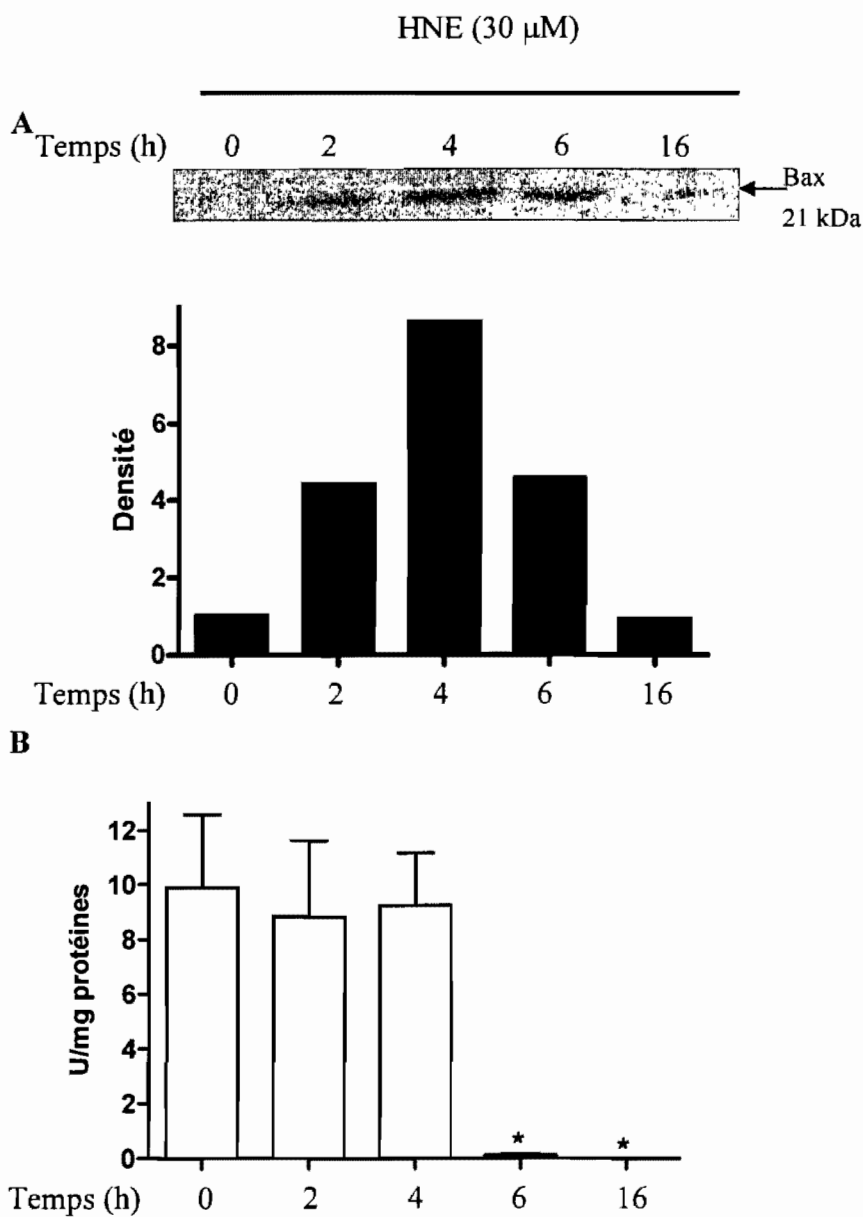


**Figure 10** : Implication du récepteur Fas dans l'induction de l'apoptose par le HNE. Les chondrocytes humain OA ont été traités (A) durant différent temps d'incubation (0, 2, 4 et 16 h) avec une concentration fixe de HNE (30  $\mu$ M) puis le niveau protéique a été mesuré par immunobuvardage de type Western et (B) durant 1 h avec et sans anticorps anti-Fas (20  $\mu$ g/mL) puis avec et sans HNE (30  $\mu$ M) durant 4 h. La viabilité a été mesurée par la méthode du MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin  $\pm$  SEM, n=3. \*\*p<0.01.

### 3.4 Bax/Bcl-2

La régulation de la perméabilité de la mitochondrie est en partie régulée par Bax et Bcl-2. Pour déterminer l'effet du HNE sur le niveau protéique de Bax et de Bcl-2, les chondrocytes ont été incubés avec une concentration fixe de HNE soit 30  $\mu\text{M}$  à différents temps d'incubation (0, 2, 4, 6 et 16 h). Les résultats obtenus pour l'expression de la protéine Bax, illustrés à la figure 11A, indiquent une augmentation de son niveau protéique à 2, 4, 6 et 16 h comparativement au niveau basal. Plus précisément, le niveau augmente jusqu'à 4 h où le maximum d'intensité est atteint puis décroît progressivement à 6 et 16 h d'incubation.

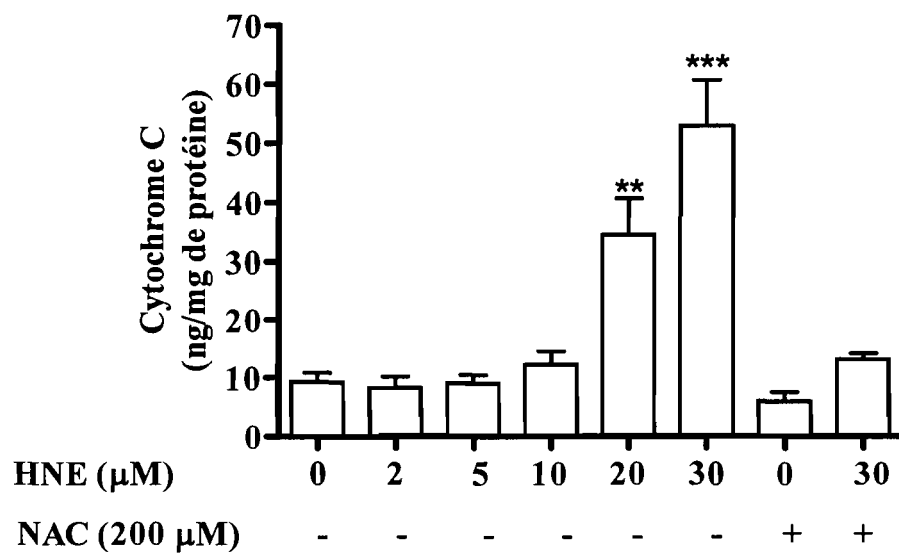
Contrairement à Bax, les résultats montrent que le HNE à 30  $\mu\text{M}$  n'exerce aucun effet sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (figure 11 B) à 2 et 4 h d'incubation (9,88 et 8,84 U/mg respectivement) comparativement aux cellules non-traitées (9,24 U/mg). Toutefois, lorsque les chondrocytes OA sont incubés avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE durant 6 et 16 h, les niveaux protéiques de Bcl-2 diminuent significativement à 0.10 et 0.00 U/mg respectivement.



**Figure 11 :** Effet du HNE sur le niveau d'expression protéique de Bax et Bcl-2. Le niveau protéique de (A) Bax a été évalué par immunobuvardage de type Western et celui de la (B) Bcl-2 a été mesuré à l'aide d'une trousse commerciale. Les chondrocytes ont été stimulés avec 30  $\mu$ M de HNE durant différentes périodes d'incubation (0, 2, 4, 6 et 16 heures). Les résultats pour Bcl-2 sont exprimés en U/mg protéines, n=3. \*p<0.05.

### 3.5 Dosage du cytochrome *c*

La libération du cytochrome *c*, suite à un changement au niveau de la perméabilité de la membrane mitochondriale, permettra l'activation de la voie intrinsèque du processus apoptotique. Les résultats attestent que suite à une incubation de 4 h, le HNE conduit à une augmentation de la présence du cytochrome *c* dans le cytosol de manière dose dépendante. En effet, comme illustré à la figure 12, la quantité de cytochrome *c* libéré dans le cytosol pour l'échantillon non-traité est de 9 ng/mg alors qu'elle est de 8, 9, 12, 34 et 52 ng/mg de protéines dans les échantillons traités avec 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$  de HNE respectivement. Toutefois, l'augmentation obtenue n'est significative que pour les échantillons traités avec 20 et 30  $\mu\text{M}$  de HNE comparativement au groupe témoin. De plus, le prétraitement des chondrocytes avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC réduit de manière significative la libération du cytochrome *c* (13 ng/mg) induit par le traitement des cellules avec 30  $\mu\text{M}$  HNE (52 ng/ml). À l'opposé, il n'y a pas de différence pour les cellules prétraitées avec le NAC comparativement aux cellules non-traitées.



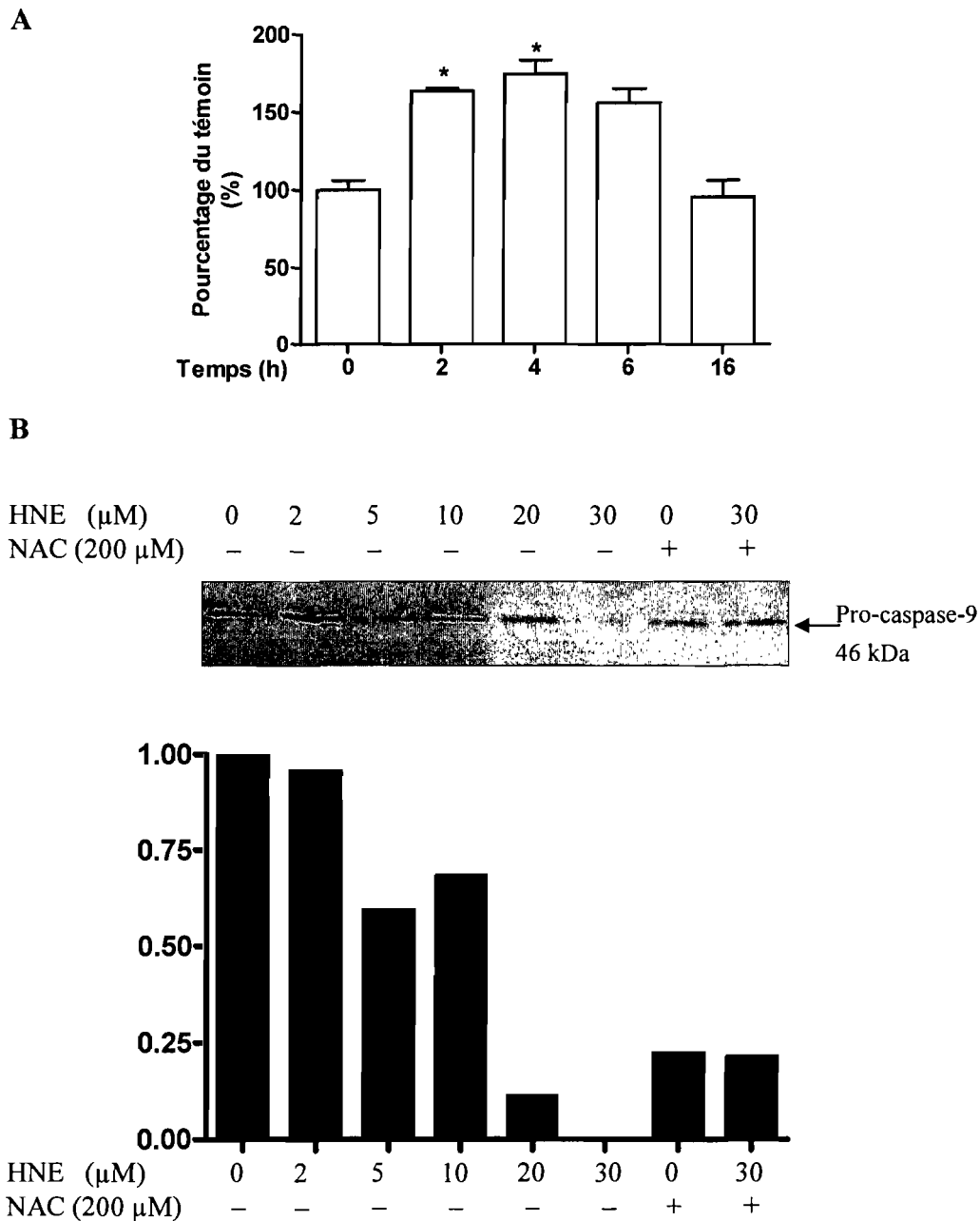
**Figure 12 :** Capacité du HNE à induire la libération du cytochrome *c* de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. Le niveau du cytochrome *c* a été quantifié dans des fractions cytosoliques des chondrocytes OA traitées avec des concentrations croissantes de HNE (0, 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ ) durant 4 h en présence ou en absence de 200  $\mu\text{M}$  de NAC. Les résultats sont exprimés en ng/mg protéines,  $n=3$ . \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .



### **3.6 Dosage de l'activité enzymatique et de niveau protéique de la caspase-9**

La caspase-9 est produite sous la forme d'une pro-enzyme qui sera clivée dans l'apoptosome lors du processus apoptotique. Le passage de la forme inactive en forme active permettra à la caspase-9 d'induire l'activation de la caspase-3. L'effet du HNE sur la caspase-9 a été mesuré au niveau de l'activité enzymatique et au niveau protéique. La mesure de l'activité de la caspase-9 est importante pour déterminer la capacité de cette enzyme à activer la caspase-3. Pour cette expérience, les cellules ont été traitées avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE durant 0, 2, 4, 6 et 16 h. Les résultats, représentés à la figure 13A, montrent une augmentation progressive et significative de l'activité de la caspase-9 pour atteindre un maximum d'activation après 4 h d'incubation soit 171% comparativement au témoin.

Pour le niveau protéique, les chondrocytes ont été traités durant 16 h avec des concentrations croissantes de HNE. Comme illustré à la figure 13B, il semble que le HNE, à faibles concentrations soit inférieures à 10  $\mu\text{M}$ , n'exerce aucun effet sur l'activation de la caspase-9 mesurée par la diminution de sa forme non-active comparativement aux cellules non traitées. En contre partie, il semble y avoir une diminution de la pro-caspase-9 suite à un traitement avec 20 et 30  $\mu\text{M}$  de HNE. De plus, le traitement des cellules avec 200  $\mu\text{M}$  NAC combiné avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE empêche en partie la diminution du niveau protéique de la pro-caspase-9.



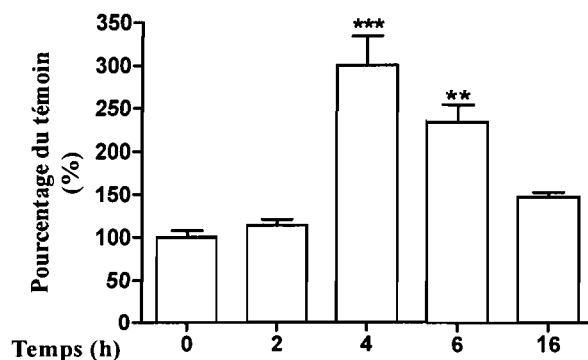
**Figure 13 :** Effet du HNE sur le niveau d'activité et protéique de la caspase-9. **(A)** L'activité de la caspase-9 a été mesurée selon le protocole fourni avec le kit utilisé. Les chondrocytes OA ont été stimulés avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE pendant 0, 2, 4, 6 et 16 h. **(B)** Le niveau protéique a été évalué par immunobuvardage de type Western sur l'extrait total des chondrocytes OA stimulés durant 16 h avec différentes concentrations de HNE (0, 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ ) en présence ou en absence de 200  $\mu\text{M}$  de NAC. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \* $p<0.05$ .

### **3.7 Dosage de l'activité enzymatique et de niveau protéique de la caspase-3**

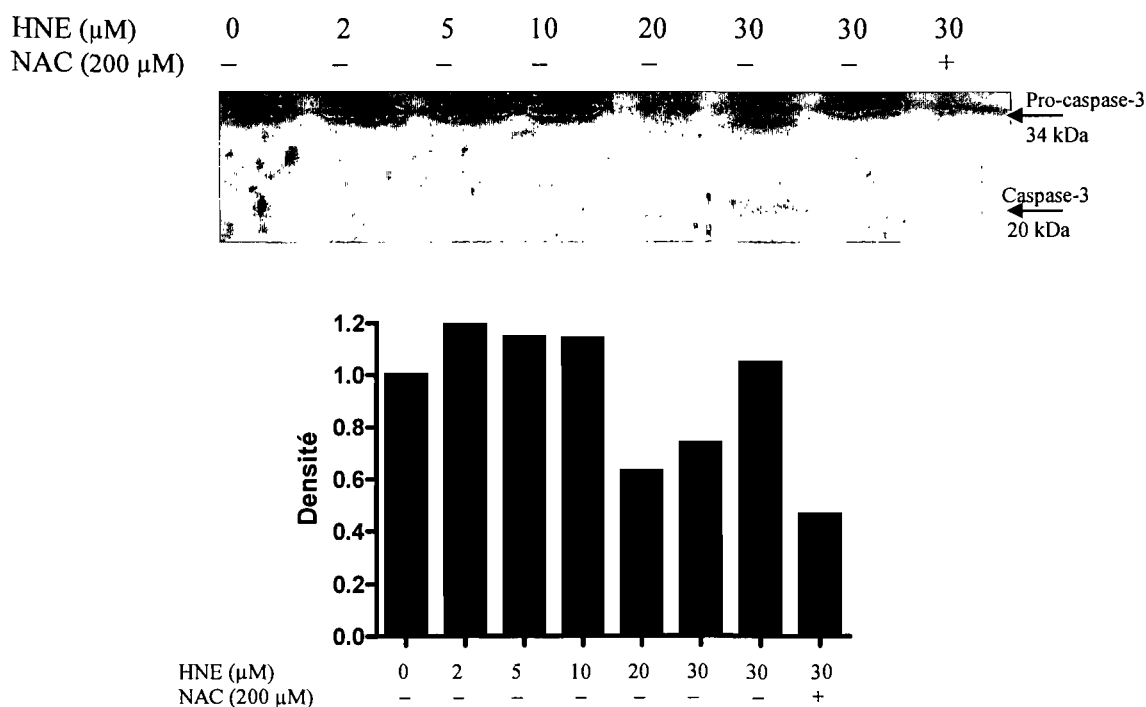
L'activation de la caspase-3 est une étape centrale dans la cascade apoptotique caspase-dépendante. Dans un premier temps, l'effet du HNE sur l'activité de la caspase-3 a été déterminée par l'incubation des chondrocytes avec 30  $\mu\text{M}$  de cet aldéhyde durant différentes périodes d'incubation. Les résultats, illustrés à la figure 14A, indiquent que le HNE à 30  $\mu\text{M}$  augmente de manière significative l'activité de la caspase-3 dans des chondrocytes incubés durant 4 et 6 h, alors que pour 2 h d'incubation aucune variation significative n'est observée (114%). Le maximum d'activité est atteint après 4 h de traitement avec une activité de 300% comparativement au témoin. De plus, après 16 h d'incubation, l'activité obtenue est légèrement supérieure au témoin (147%) sans toutefois être significative.

Le clivage de cette pro-enzyme est indispensable à son activation. L'effet du HNE sur cette enzyme a été étudié dans un second temps au niveau protéique où les chondrocytes ont été traités pendant 16 h avec différentes concentrations de HNE ou avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC en présence ou en absence de 30  $\mu\text{M}$  de HNE. Les résultats (figure 14B) montrent que le HNE à 20 et 30  $\mu\text{M}$  diminue le niveau de la pro-caspase-3 et que cette diminution est associée avec l'apparition de la forme active de cette enzyme. Toutefois, le pré-traitement des cellules avec 200  $\mu\text{M}$  NAC réduit partiellement la diminution de la forme pro-caspase-3.

A



B



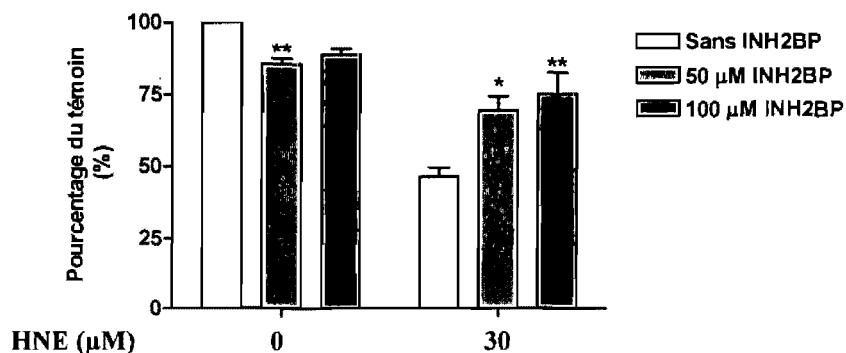
**Figure 14 :** Effet du HNE sur l'activité et sur le niveau protéique de la caspase-3. **(A)** L'activité de la caspase-3 a été mesurée selon le protocole fourni avec la trousse utilisée. Les chondrocytes humains OA ont été stimulés avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE pendant 0, 2, 4, 6 et 16 heures. **(B)** L'expression protéique a été évaluée par immunobuvardage de type Western sur l'extrait total de chondrocytes OA stimulés durant 16 h avec différentes concentrations de HNE (0, 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ ) avec ou sans prétraitement avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC durant 1 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin  $\pm$  SEM,  $n=3$ . \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

### 3.8 Effet de HNE sur l'activation de PARP

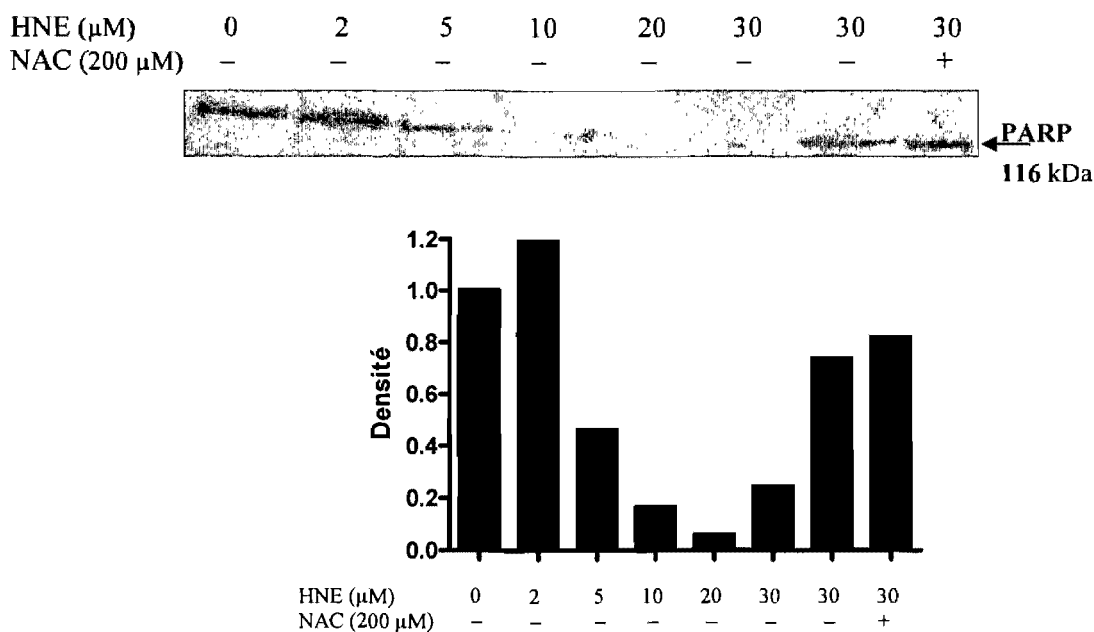
Dans un premier temps, pour étudier l'implication de PARP dans l'induction de l'apoptose par le HNE, l'effet d'un inhibiteur de la PARP a été déterminé sur la prévention de la mort cellulaire des chondrocytes incubés avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE durant 4 h, en présence ou en absence de 50 et 100  $\mu\text{M}$  de cet inhibiteur. Les résultats, présentés à la figure 15A, montrent que l'inhibiteur seul à 50 et à 100  $\mu\text{M}$  induit une diminution significative de la viabilité de 14 et 11% respectivement. Toutefois, la cytotoxicité du HNE est diminuée en présence de cet inhibiteur. La diminution de la viabilité est environ de 53, 31, et 25% en présence du HNE seul, du HNE + 50  $\mu\text{M}$  INH2BP et du HNE + 100  $\mu\text{M}$  INH2BP respectivement.

Dans un second temps, l'évaluation du niveau protéique de cette enzyme a été réalisée chez des chondrocytes traités durant 16 h avec des concentrations croissantes de HNE combinées ou non avec le NAC. Les résultats présentés à la figure 15B démontrent un clivage de la forme pro-PARP de façon dose dépendant. En effet, le clivage est observé à 5  $\mu\text{M}$  de HNE et s'accroît progressivement à 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ . À l'opposé, aucun changement n'a été noté chez les cellules non-traitées, traitées avec 2  $\mu\text{M}$  de HNE et celles traitées avec 30  $\mu\text{M}$  HNE en présence de 200  $\mu\text{M}$  de NAC.

A



B



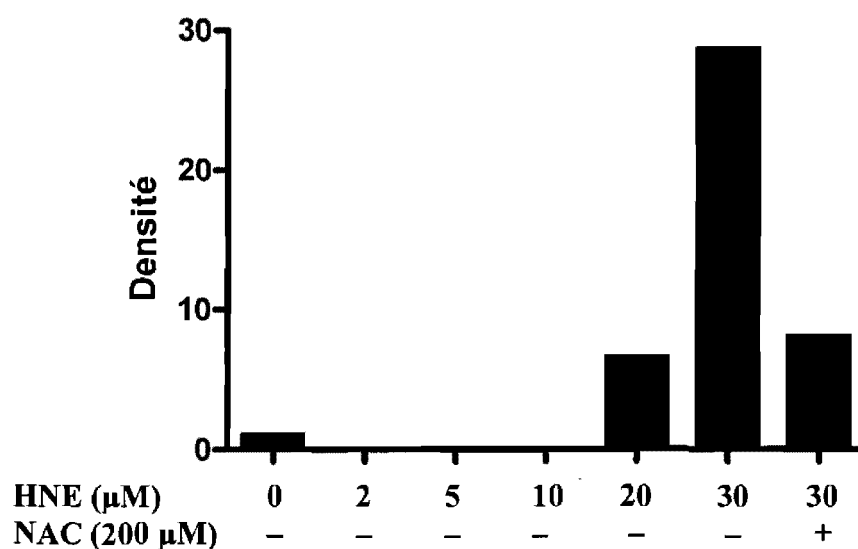
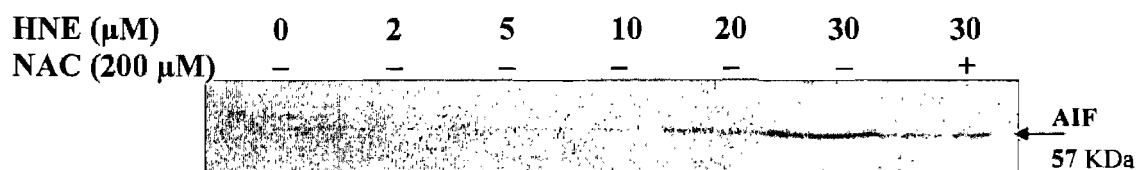
**Figure 15 :** Rôle de l'activation du PARP sur la viabilité cellulaire des chondrocytes humain OA stimulés avec le HNE. **(A)** Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de l'inhibiteur de PARP, l'INH2BP (0, 50 et 100 μM) durant 1 h suivie d'une incubation de 4 h en présence ou en absence de 30 μM HNE. La viabilité a été évaluée par la méthode du MTT. **(B)** L'expression protéique de PARP a été évaluée par immunobuvardage de type Western dans l'extrait total de chondrocytes OA stimulés durant 16 h avec différentes concentrations de HNE (0, 2, 5, 10, 20 et 30 μM) avec ou sans prétraitement avec 200 μM de NAC durant 1 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin ± SEM, n=3. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### **3.9 Dosage protéique de l'AIF dans les noyaux**

Lors de sa libération de la mitochondrie, l'AIF induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. La présence de l'AIF dans les noyaux a été mesurée par immunobuvardage de type Western dans l'extrait nucléaire des chondrocytes. Les résultats, illustrés à la figure 16, montrent une augmentation remarquable de la présence de l'AIF dans les noyaux lorsque les cellules sont incubées avec 20 et 30  $\mu\text{M}$  HNE. Par ailleurs, un prétraitement préalable durant 1 h avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC empêche la translocation de l'AIF dans les noyaux des chondrocytes.

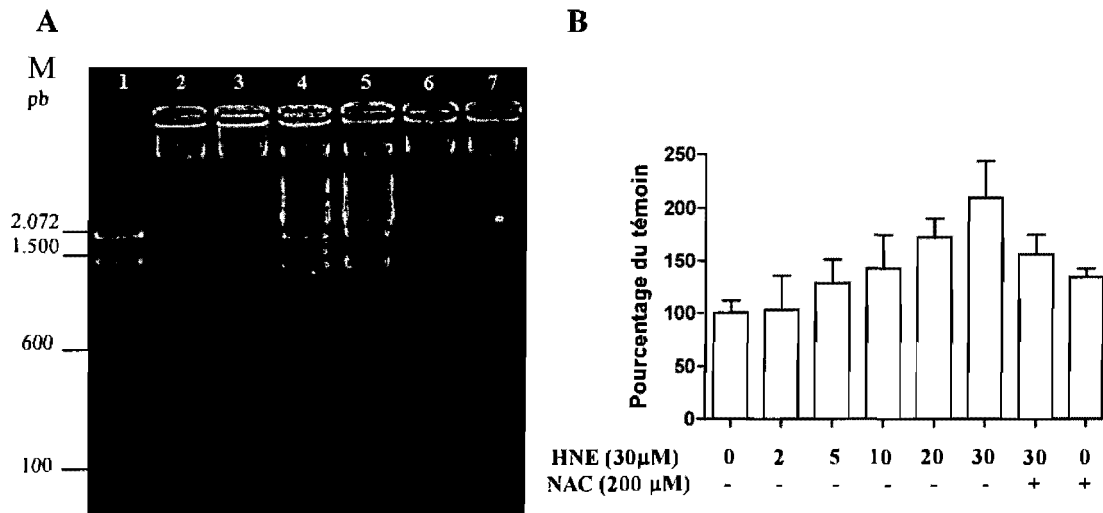
### **3.10 Fragmentation de l'ADN**

Lors du processus apoptotique, l'ADN génomique exposé sera digéré par des endonucléases donnant lieu à la formation de nucléosomes (180-200 paires de bases de l'ADN enroulées autour des histones). Le phénomène de fragmentation résultant du traitement des chondrocytes avec différentes concentrations de HNE a été dans un premier temps visualisé sur gel d'agarose. L'analyse du profil de l'ADN ne montrent aucune fragmentation pour le contrôle, le NAC seul (200  $\mu\text{M}$ ) et le HNE (10  $\mu\text{M}$ ) (Figure 17A). À l'opposé, une forte présence de fragmentation est constatée lorsque les cellules sont traitées avec 20 et 30  $\mu\text{M}$  de HNE mais, cet effet est grandement diminué par le prétraitement de cellules avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC une heure avant l'ajout du HNE (30  $\mu\text{M}$ ).



**Figure 16 :** Effet du HNE sur la translocation de l'AIF dans les noyaux. L'expression protéique de l'AIF est évaluée par immunobuvardage de type western sur l'extrait nucléaire des chondrocytes humains OA pré-incubés en présence et en absence de 200  $\mu\text{M}$  de NAC durant 1 h suivie par une stimulation de 16 h avec des concentrations croissantes de HNE (0, 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$ ). Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.



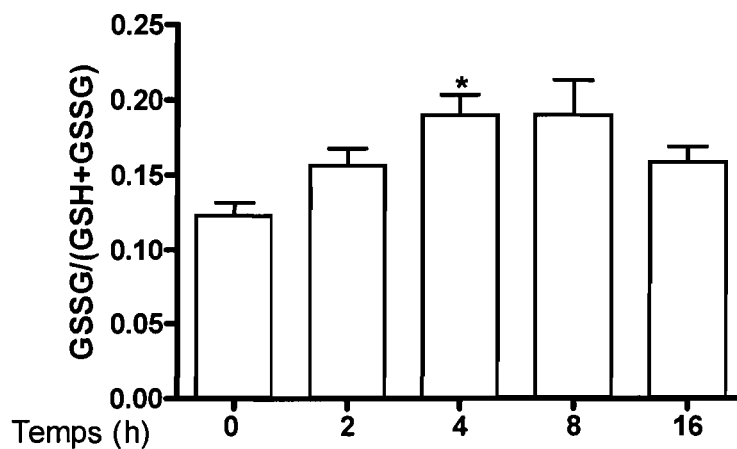


**Figure 17 :** L'étude de la fragmentation de l'ADN dans les chondrocytes humains OA induite par le HNE. Les nucléosomes ont été isolés à l'aide d'une trousse commerciale à partir des chondrocytes OA incubés durant 4 h avec différentes concentrations de HNE avec ou sans 200 µM de NAC puis analysés sur gel d'agarose (**A**) ou quantifiés à l'aide d'une trousse (**B**). Pour le gel d'agarose, les puits sont : 1: standard, 2: contrôle, 3: 10 µM HNE, 4: 20 µM HNE, 5: 30 µM HNE, 6: 30 µM HNE + 200 µM NAC, 7: 200 µM NAC.

Dans un second volet, la quantification des nucléosomes illustré à la figure 17B révèlent une augmentation progressive du nombre de nucléosome suite au traitement des chondrocytes avec 2, 5, 10, 20 et 30  $\mu\text{M}$  (103, 128, 142, 172 et 209 % comparativement au contrôle respectivement) toutefois, la différence n'est pas significative. L'augmentation semble être renversée par le prétraitement des cellules avec 200  $\mu\text{M}$  de NAC durant une heure où le pourcentage de nucléosome par rapport au contrôle est moins élevé (156%) comparativement aux cellules traitées avec 30  $\mu\text{M}$  de HNE seul, toutefois il demeure significativement plus élevé que le témoin.

### **3.11 Détermination de l'état redox intracellulaire**

La détoxification du HNE intracellulaire s'effectue en grande partie par sa conjugaison avec le GSH. Lors de la réduction des agents oxydants, deux molécules de ce dernier composent la forme oxydée du GSH, le GSSG. Dans cette étude, nous avons déterminer l'effet du HNE sur les changements de l'état redox en mesurant le rapport GSH oxydé/GSH total  $[\text{GSSG}/(\text{GSH}+\text{GSSG})]$ . Les résultats (figure 18A) montrent une augmentation significative du rapport  $\text{GSSG}/(\text{GSSG} + \text{GSH})$  lorsque les cellules sont incubées pendant 4 heures en présence de 30  $\mu\text{M}$  de HNE. Cette augmentation est de l'ordre de 154% après 4 h d'incubation.

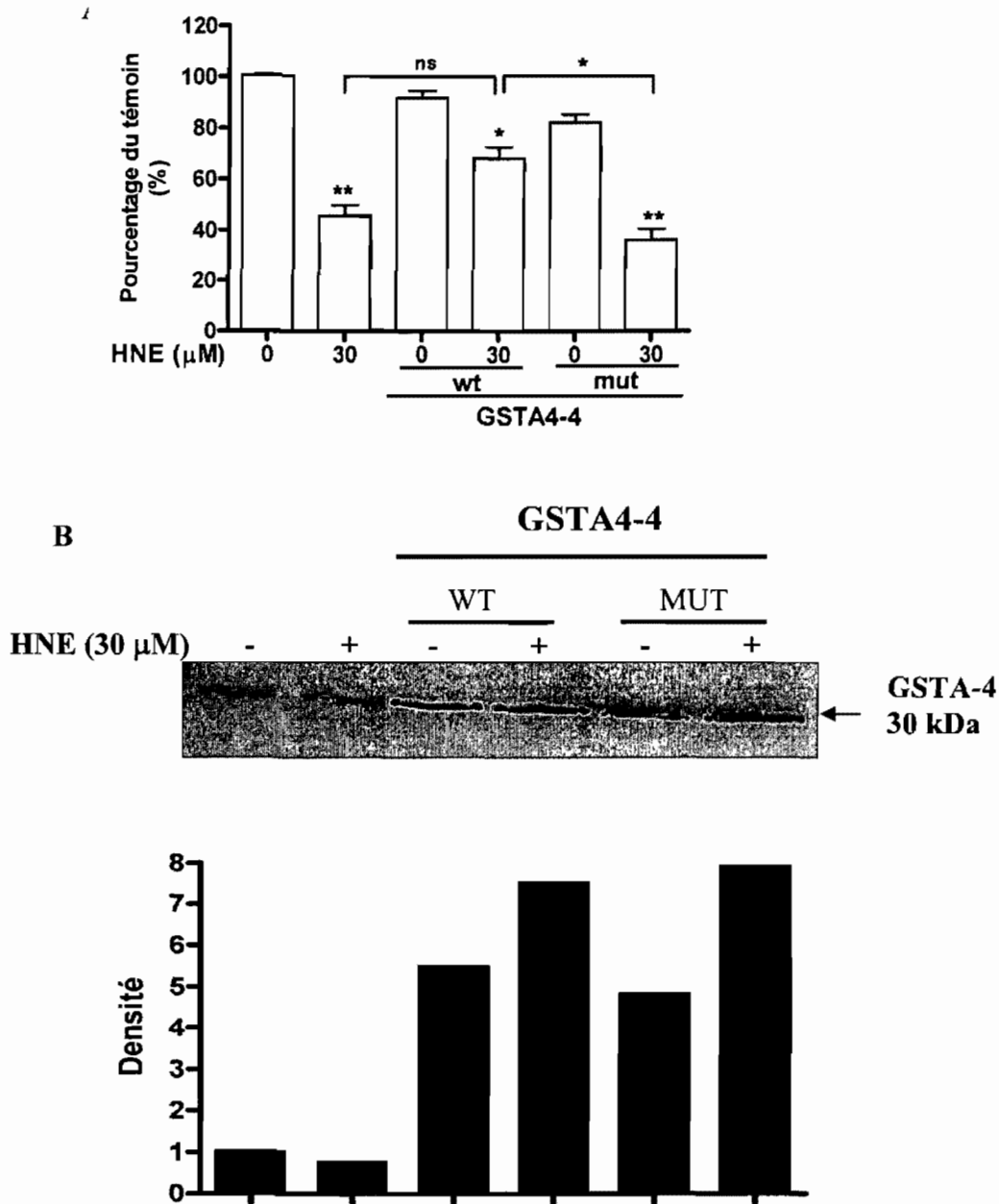


**Figure 18** : Effet de HNE sur l'état redox dans les chondrocytes humains OA. Le dosage du GSH et du GSSG a été effectué dans l'extrait cellulaire des chondrocytes traitées avec 30  $\mu$ M de HNE durant 0, 2, 4, 8 et 16 h en utilisant une trousse commerciale n=3. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

### **3.12 Le rôle de la GST-A4 dans la protection contre la cytotoxicité du HNE**

Dans le but de déterminer le rôle de la GST-A4 dans la prévention de la cytotoxicité du HNE, les chondrocytes OA ont été préalablement transfectés avec des vecteurs d'expression de la GST-A4 sauvage et mutée puis incubés avec 30  $\mu$ M de HNE. Tel qu'illustré à la figure 19A, la présence du HNE seul diminue d'environ  $54 \pm 7\%$  la viabilité cellulaire comparativement aux cellules non traitées. Cependant, la surexpression de la GST-A4 dans les chondrocytes attribue une résistance importante à ces cellules au HNE, soit une viabilité cellulaire d'environ  $68 \pm 9\%$ . Les chondrocytes exprimant la GST-A4 mutée voient leur résistance diminuée au HNE soit de  $64 \pm 8\%$  comparativement au témoin.

De plus nous avons examiné par immunobuvardage type Western le niveau d'expression de la GST-A4. Les résultats présentés dans la figure 19B viennent confirmer que les effets observés sont attribués à l'expression de la GST-A4 dans les chondrocytes OA.



**Figure 19** : Effet de la GST-A4 dans la protection contre la cytotoxicité du HNE. (A) Les SW1353 ont été transfectés avec des vecteurs d'expression de la GST-A4 sauvage et mutée puis incubés avec 30 μM de HNE durant 4 h. La viabilité a été évaluée par la méthode du MTT. (B) L'expression protéique de la GST-A4 a été évaluée par immunobuvardage de type Western dans l'extrait total de chondrocytes OA. n=3 \*p<0.05, \*\*p<0.01.

# **CHAPITRE IV : DISCUSSION**

Cette étude a permis de démontrer l'importance du HNE dans le processus apoptotique des chondrocytes OA humains. Dans le cartilage, les chondrocytes jouent un rôle central en contribuant au maintien de l'homéostasie via la synthèse et la dégradation des composantes de ce tissu. Dans l'OA, le maintien de l'homéostasie est compromis aboutissant à la destruction du cartilage. Plusieurs études tendent à démontrer que ces caractéristiques, précédemment citées, pourraient être causées par une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans la couche superficielle et moyenne du cartilage articulaire (Blanco et al., 1998; Kim et al., 2000). En effet, il a été rapporté, dans la littérature, une possible corrélation entre le degré de l'OA et l'augmentation de l'apoptose (Hashimoto et al., 1998a). Il est donc important de considérer l'apoptose des chondrocytes comme une cause possible de cette maladie.

D'après la littérature, le phénomène apoptotique observé pourrait résulter de changements métaboliques au niveau de la mitochondrie, telle que la diminution de l'activité des complexes II et III dans la chaîne de transport des électrons (Blanco et al., 2004). Les changements métaboliques peuvent être perceptibles par des changements morphologiques (Lee et al., 2000). Il est maintenant bien établi que la mitochondrie joue un rôle clé dans le processus apoptotique. Elle agit principalement en libérant des facteurs apoptotiques tels l'AIF et le cytochrome *c* dans le cytosol lors de la perturbation de son potentiel membranaire. Elle peut agir en libérant d'autres facteurs apoptotiques comme Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 et EndoG (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Suzuki et al., 2001). Ces derniers semblent faciliter l'activation des caspases par leur capacité à se

lier et à inhiber des protéines faisant partie de la famille des IAP (Liu et al., 2000b; Martins et al., 2002). De plus, HtrA2/Omi possède une activité serine protéase qui semble contribuer à un processus de la mort cellulaire caspase-indépendant (Suzuki et al., 2001).

Bien que le phénomène apoptotique semble jouer un rôle dans l'OA, les causes menant à l'apoptose des chondrocytes restent nébuleuses. Plusieurs facteurs ont été étudiés comme de possibles inducteurs, parmi ceux-ci, les ROS tel que le NO semblent être une possibilité. Les ROS sont produits dans des conditions normales, pathologiques ou d'autres conditions de stress. Ils ont la capacité de modifier les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides. Lorsque les ROS attaquent la membrane plasmique de la cellule, il y aura une cascade de réactions enzymatiques et non-enzymatiques conduisant à la formation d'aldéhydes très réactifs comme le HNE et le malondialdéhyde qui sont produits lors du processus de la peroxydation lipidique. Comparativement aux radicaux libres, ces aldéhydes produits sont relativement stable et peuvent diffuser à l'intérieur de la cellule et se lier à des cibles loin de l'emplacement de leur origine (Uchida, 2003). Les propriétés de ces aldéhydes appuient le fait qu'ils puissent jouer un rôle dans le phénomène apoptotique observé.

Le rôle du HNE dans le processus de signalisation est d'un grand intérêt par son effet dose-dépendent. Bien qu'à faible concentration, il module la prolifération cellulaire, il est intéressant de noter qu'à forte concentration il a des effets toxiques. En effet, il peut moduler la signalisation et stimuler la différenciation et l'apoptose dans plusieurs types



cellulaires (Venn, 1978; Esterbauer et al., 1991; Barrera et al., 1991; Zarkovic et al., 1993; Kruman et al., 1997; Kreuzer et al., 1998; Ruef et al., 1998; Uchida et al., 1999; Dianzani et al., 1999; Cheng et al., 1999; Chiarpotto et al., 1999; Cheng et al., 2001a; Cheng et al., 2001b; Dianzani, 2003; Yang et al., 2003).

Nos résultats montrent que le HNE, à une concentration égale ou supérieure à 20  $\mu\text{M}$  semble induire l'apoptose des chondrocytes OA humain. Pour parvenir à cette conclusion, nous avons dans un premier temps étudié l'effet du HNE sur l'activité de la fonction déshydrogénase de la mitochondrie en utilisant le réactif MTT. Ce dernier est réduit en formazan bleu par les déshydrogénases mitochondriales. Ces enzymes sont présentes uniquement dans les cellules vivantes et qui sont métaboliquement actives (Altman, 1976). Les résultats obtenus montrent que le HNE à 20 et à 30  $\mu\text{M}$  semble induire une diminution significative et progressive de la viabilité des chondrocytes OA dès 4 h d'incubation. Toutefois, cette méthode ne permet pas de faire la distinction entre les cellules mortes par nécrose et celles mortes par apoptose (McKeague et al., 2003). Ces résultats sont en accord avec la littérature puisque le HNE induit, dans plusieurs types cellulaires, une diminution de la viabilité cellulaire. Cette diminution est principalement attribuée à l'induction de l'apoptose dans ces différents types cellulaires.

Pour faire suite à la précédente expérience, nous avons cherché à savoir comment le HNE agit sur les principales voies apoptotiques dans les chondrocytes OA humains. Dans la littérature, l'induction de l'apoptose se fait principalement suite à l'activation des caspases initiatrices comme la caspase-8 et -9. Il a été rapporté que le HNE peut se lier

directement à des récepteurs à la surface de la cellule et causer leur activation. Nous avons cherché à savoir si le HNE a des effets sur le récepteur Fas. Les résultats obtenus dans ce présent travail montrent que le récepteur Fas pourrait être impliqué dans l'induction de l'apoptose des chondrocytes OA humains par le HNE. En effet, en présence de 30  $\mu$ M de cet aldéhyde, le blocage du récepteur Fas par un anticorps anti-Fas protège les chondrocytes contre la cytotoxicité du HNE comparativement aux cellules traitées avec le HNE seul. Toutefois, il faut prendre en considération que l'anticorps anti-Fas est aussi utilisé comme inducteur de l'apoptose dans certains types cellulaires et comme inhibiteur de l'apoptose dans d'autres. La baisse de la viabilité cellulaire des chondrocytes par l'ajout de l'anticorps anti-Fas peut expliquer l'effet pro-apoptotique de cet anticorps. De plus, le HNE à 30  $\mu$ M semble augmenter le niveau protéique du récepteur Fas après 16 h de traitement. Ces résultats ne sont pas suffisants pour prouver la liaison du HNE au récepteur Fas. Toutefois, ils semblent démontrer un possible lien entre le HNE et ce récepteur. De nouvelles expériences devraient être menées afin d'étudier la liaison possible entre cet aldéhyde et le récepteur Fas.

Pour faire suite à l'étude du récepteur Fas, nous avons étudié l'effet du HNE sur l'activation de la principale caspase de la voie apoptotique extrinsèque, la caspase-8. Les résultats indiquent que le HNE active la caspase-8. En effet, nous avons constaté une diminution importante du niveau protéique de la pro-caspase-8 après 16 h d'incubation avec 30  $\mu$ M de HNE. Cette diminution est possiblement attribuable au clivage du pro-domaine. Pour renforcer cette hypothèse, l'activité de la caspase-8 a été mesurée. Les résultats montrent une augmentation progressive de l'activité de la caspase-8 en fonction

du temps en présence de HNE. L'activation de la caspase-8 peut résulter de l'activation du récepteur Fas. Toutefois, l'activation de cette caspase n'est pas restreinte aux récepteurs de mort cellulaire, mais elle peut être activée par d'autres stimuli proapoptotiques dans une voie indépendante de l'activation de Fas (Ferrari et al., 1998). L'augmentation de l'activité de la caspase-8 qui est observée dès 2 h d'incubation et l'implication du récepteur Fas dans l'apoptose des chondrocytes induit par le HNE laisse croire que l'activation de la voie extrinsèque est impliquée dans le processus apoptotique induit par cet aldéhyde. En effet, dans la littérature, il a été montré que le HNE induit l'activation de cette caspase initiatrice dans les cellules RKO (Ji et al., 2001). Toutefois, il semble que même si cette voie est induite par le HNE dans le processus apoptotique, son activation ne soit pas essentielle à l'induction de l'apoptose. En effet, les travaux menés par Rabacchi ont montré que la caspase-3, -7 et -9 ainsi que leurs régulateur APAF-1 et DIABLO/Smac sont nécessaires à l'induction de l'apoptose par le HNE. En contre partie, les caspases-1, -2, -6 et -8 ne sont pas requises (Rabacchi et al., 2004). Il est vrai que les caspases peuvent être activées sans toutefois causer la mort cellulaire. Il est donc nécessaire d'inactiver spécifiquement chacune des enzymes pour identifier si elles jouent un rôle essentiel dans l'induction du processus apoptotique (Stefanis et al., 1996; Krohn et al., 1998; Troy et al., 2000; Troy et al., 2001). Comme cette démonstration a été effectuée dans des cellules neuronales, il serait intéressant de savoir si ce sont les mêmes caspases qui sont essentielles dans l'apoptose des chondrocytes OA humains induite par le HNE.

En plus de la voie apoptotique extrinsèque, une seconde voie, la voie intrinsèque, semble être induite suite à l'exposition des cellules au HNE. L'activation de cette cascade apoptotique débute par la libération du cytochrome *c* de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie vers le cytosol. Cette étape sera suivie par l'activation d'une autre caspase initiatrice, la caspase-9. Les résultats obtenus semblent démontrer l'activation de cette voie apoptotique lorsque des chondrocytes sont incubés avec le HNE. Le dosage par ELISA montre que le HNE augmente le niveau du cytochrome *c* libéré par la mitochondrie dans le cytosol. Nous avons par la suite investigué l'activation de la caspase-9 par le HNE. Les résultats démontrent une quasi absence de la pro-caspase-9 lorsque les chondrocytes OA sont stimulés avec le HNE à 20 et 30  $\mu\text{M}$ . Pour s'assurer de l'intégrité de l'enzyme, l'activité de la caspase-9 a été mesurée. Les résultats montrent que, dès 2 h d'incubation, le HNE induit une augmentation significative de l'activité enzymatique de la caspase-9. Cette activité atteint son niveau maximum après 4 h d'incubation et décroît progressivement. En se référant à la littérature, il a été démontré, dans plusieurs types cellulaires, que l'induction de l'apoptose par le HNE se produit via l'activation de la caspase-9 précédé par le relargage du cytochrome *c* dans le cytosol (Ji et al., 2001; Rabacchi et al., 2004). Dans cette voie, la libération du cytochrome *c* par la mitochondrie peut être induite par la caspase-8. En effet, le facteur pro-apoptotique Bid qui fait partie de la famille de Bcl-2 contient un domaine BH3 important pour son activité pro-apoptotique et pour interagir avec les autres membres de la famille Bcl-2. Suite à son clivage par la caspase-8, la partie C terminale de Bid contenant le domaine BH3 sera transloquée dans la mitochondrie et permettra la libération du cytochrome *c*. Toutefois, ce lien entre les deux voies n'a pas été étudié.

De plus, la libération du cytochrome *c* contenu dans la mitochondrie est régulée par le facteur anti-apoptotique Bcl-2 et son homologue pro-apoptotique Bax. Le ratio entre ces deux facteurs est important dans le maintien de l'intégrité de la mitochondrie. Le changement du ratio Bax/Bcl-2 en faveur de Bax conduira à la libération du cytochrome *c*. Les résultats obtenus suite à l'étude de ces facteurs pro et anti-apoptotiques montrent que le HNE induit une augmentation du niveau protéique de Bax suite à 2 h d'incubation et une diminution drastique du niveau de Bcl-2 suite à 6 h d'incubation. Il semble que le HNE ait la capacité de moduler le niveau protéique de Bax et Bcl-2 contribuant possiblement à la libération du cytochrome *c* par la mitochondrie. Suite à ces résultats, il serait intéressant de mesurer le niveau d'expression de l'ARNm de ces deux facteurs. En accord avec nos résultats, il a été rapporté dans la littérature que le HNE semble induire l'apoptose en induisant une augmentation du niveau protéique de Bax et une diminution de celui de Bcl-2 (Lee et al., 2004).

L'activation de la voie intrinsèque et extrinsèque, illustrée précédemment, converge vers l'activation de la caspase-3, une caspase effectrice grandement étudiée dans le phénomène apoptotique. Après avoir observé une activation des caspases initiatrices soit les caspases-8 et -9, nous avons étudié l'activation de la caspase-3 par le HNE. Il semble que le HNE à une concentration égale ou supérieure à 20  $\mu\text{M}$  ait la capacité de cliver la pro-caspase-3 en caspase-3 active. De plus, il semble qu'il induit une augmentation significative de l'activité de la caspase-3 après 4 h d'incubation. L'activation de la

caspase-3 semble se produire subséquemment à l'activation des caspases-8 et -9 qui se produisent suite à 2 h d'incubation ce qui correspond à la littérature (Kutuk et al., 2006).

De plus, il est possible que la caspase-3 soit activée par elle-même. Il a été récemment rapporté que la caspase-3 peut s'auto-cliver suggérant qu'elle peut être activée sans signal provenant des récepteurs de mort cellulaire ou de la mitochondrie (Liu et al., 2000a). En effet, le HNE par la modification de l'état redox peut induire l'auto-activation des caspases car le site actif des caspases contient une cystéine qui est sensible à l'état redox (Liu et al., 2000a). Toutefois, cette possibilité n'a pas été investiguée dans cette étude.

Dans la littérature, il a été aussi rapportée que l'activation de la caspase-3 peut résulter de l'activation de JNK (Cheng et al., 2001b), une protéine kinase nécessaire à l'activation de la voie intrinsèque plus précisément lors de la libération du cytochrome *c* par la mitochondrie. Toutefois, sa présence n'est pas requise lors de l'activation de la voie extrinsèque. Bien qu'il ait été démontré que l'activation de JNK induit la libération du cytochrome *c*, le mécanisme n'est pas totalement élucidé. Précédemment, notre laboratoire a démontré que le HNE à 10  $\mu$ M, active légèrement, dans les chondrocytes humains OA, les JNK1/2 et ERK1/2 (Morquette et al., 2006). Il est possible qu'à fortes concentrations, le HNE augmente considérablement l'activité de ces protéines kinases. Dans la littérature, il a été suggéré que l'induction de l'activation de JNK par le HNE conduise à l'activation de la caspase-3 et à la transcription de plusieurs gènes AP-1-dépendants. Récemment, il a été rapporté que l'augmentation de JNK est suivie par

l'activation de Bax et de la dépolarisation de la mitochondrie produisant la libération du cytochrome c et de l'AIF de façon caspase indépendante (Boisvieux-Ulrich et al., 2005). Comme suite de ce travail, il serait intéressant d'inhiber l'activation de JNK pour déterminer son implication dans l'activation de la voie intrinsèque et dans l'activation de la caspase-3 par le HNE. De plus, il serait intéressant de déterminer si son inhibition permet de contrer la diminution de la viabilité induite par le HNE.

Lors du processus apoptotique, la fragmentation de l'ADN est souvent constatée. Les résultats présentés dans cette étude montrent que le HNE à 20 et 30  $\mu\text{M}$  induit la fragmentation de l'ADN dans les chondrocytes humains OA ainsi que la condensation de la chromatine. Plusieurs études ont rapporté que le HNE semble induire la fragmentation de l'ADN possiblement suite à l'activation des caspases (Zhang et al., 2001). Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'utiliser un inhibiteur des caspases comme ZVAD pour vérifier s'il parvient à inhiber partiellement ou totalement la fragmentation de l'ADN induite par le HNE dans les chondrocytes OA.

La fragmentation de l'ADN peut être induite via l'intervention de l'action de la *caspase-activated DNase* ou de la PARP. Dans ce projet, nous avons étudié l'effet du HNE sur l'activation du PARP seulement. Les PARP se composent principalement de la PARP-1 (113 kDa) et de la PARP-2 (63 kDa). L'activation excessive de la PARP-1 résulte en la translocation de l'AIF de la mitochondrie vers le noyau. L'AIF, une fois dans le noyau va provoquer la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Nos données montrent que la PARP-1 est activée par le HNE de façon dose-

dépendante. Une faible activation du PARP est observée lorsque les chondrocytes sont incubés avec 5 et 10  $\mu\text{M}$  de HNE. Toutefois, à 20 et 30  $\mu\text{M}$ , il y a une forte activation de cette enzyme. En concordance avec ces résultats, l'étude de la translocation de l'AIF dans le noyau montre que le HNE augmente le niveau de l'AIF dans le noyau en particulier à 30  $\mu\text{M}$ . Étant donné que la libération de l'AIF peut être caspase-dépendante et caspase-indépendante, la présence de l'AIF dans les noyaux peut résulter de l'activation des voies apoptotiques caspase-dépendante présentée précédemment ou encore résulter de l'activation de la PARP-1. L'inhibition de PARP par un inhibiteur spécifique a montré une augmentation significative mais partielle de la viabilité, prouvant son implication dans l'induction de l'apoptose par le HNE. Dans la littérature, il y a peu de documentation sur la capacité du HNE à induire la libération de l'AIF de la mitochondrie. Cependant, une étude a rapportée que le traitement, *in vitro*, des mitochondries provenant de cerveaux de rat avec le HNE à 50  $\mu\text{M}$  durant 1 h induit la libération de l'AIF (Ramachandran et al., 2001).

Dans le but de comprendre le rôle l'état redox dans l'induction de l'apoptose par le HNE, nous avons d'une part vérifié la capacité du HNE d'altérer le niveau intracellulaire du GSH, un composé très important du système antioxydant, et d'autre part, nous avons déterminé le rôle de la GST-A4 dans la protection contre la mort des chondrocytes induite par le HNE. Tout d'abord, nous avons observé que le HNE à 30  $\mu\text{M}$  diminue le niveau intracellulaire du GSH après 2 h d'incubation. Plusieurs études ont démontré que la déplétion de GSH peut être un événement précoce dans le processus apoptotique et peut conduire à une augmentation de la sensibilité des cellules à l'apoptose (Merad-



Boudia et al., 1998;Celli et al., 1998). Dans plusieurs types cellulaires, il a été rapporté que le HNE induit une diminution du niveau du GSH intracellulaire de façon temps et dose dépendent (Liu et al., 2000a). Dans les cellules RKO, le HNE à 30 et 60  $\mu$ M est capable de réduire rapidement le niveau du GSH après 15 min de traitement pour atteindre son plus bas niveau à 2 h d'incubation puis commence à augmenter graduellement (Ji et al., 2001). L'augmentation du GSH a été expliquée par la stimulation de l'expression des enzymes impliquées dans l'élimination du HNE telle que la GST. De surcroît, comme le HNE est une petite molécule capable de traverser la membrane cytoplasmique, il peut agir directement sur le GSH ou encore diminuer le niveau intracellulaire de celui-ci par l'inhibition de la GSH synthase. Toutefois, la littérature rapporte un niveau élevé de GSSG intracellulaire suite au traitement au HNE suggérant une interaction directe du HNE avec le GSH. En accord avec la littérature, les résultats obtenus montrent que le HNE augmente le niveau de GSSG intracellulaire.

La diminution du niveau de GSH peut rendre la caspase-3 plus susceptible à l'inactivation en facilitant les modifications au résidu cystéine ou par une alkylation directe par les aldéhydes à ce même résidu. En effet, il a été démontré que les aldéhydes comme le HNE peuvent bloquer l'activation de la caspase-3 et l'inactiver. De plus, il semble qu'ils aient des effets similaires pour la caspase-8 et -9 (Finkelstein et al., 2005). La déplétion du GSH induite par le HNE décrite précédemment pourrait expliquer la diminution de l'activité de la caspase-3 et -9 observé à 6 et 16 h. Toutefois, l'activité de la caspase-8 ne subit pas la même diminution à 6 et 16 heures. À l'opposé, l'activité semble augmenter pour ces deux temps d'incubation. Ceci pourrait être expliqué par la

diminution drastique de l'ATP lors du processus apoptotique surtout lorsque la PARP est activée (Kehe et al., 2007). La diminution du niveau d'ATP affecte l'activité de la caspase-3 et -9 (Ferrari et al., 1998). Contrairement à ces deux caspases, l'activation de la caspase-8 résultant de l'activation du récepteur Fas n'est pas affecté par cette diminution (Ferrari et al., 1998). Il est donc possible que l'altération du niveau d'ATP intracellulaire pourrait expliquer la différence au niveau de l'activité entre la caspase-8 et les caspases-3 et -9.

Pour étudier spécifiquement l'implication de la GST-A4 dans la régulation intracellulaire du HNE et en conséquence la mort cellulaire, les chondrocytes ont été transfectés avec des constructions plasmidiques exprimant cette enzyme sauvage ou mutée. Nous avons montré que la sur-expression de la GST-A4 dans les cellules protège ces dernières contre la cytotoxicité du HNE. Cette protection pourrait être attribuée à l'accélération de l'élimination du HNE ajouté aux cellules. Awasthi et coll. ont été les premiers à démontrer que l'induction de l'apoptose par le HNE peut être bloqué dans les cellules K562 et HL-60 transfectées de façon stable avec des vecteurs d'expression de la GST-A4 (Cheng et al., 1999; Cheng et al., 2001b; Awasthi et al., 2003). La prévention de l'apoptose par cette enzyme est associée avec une inhibition de l'activation de JNK et de l'AP-1 par le HNE. D'autres études ont indiqué que la GST-A4 est capable aussi de moduler plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation via la régulation du niveau intracellulaire du HNE.

Par ailleurs, notre étude a montré également que l'ajout d'un antioxydant, le NAC, fourni une résistance importante à la cytotoxicité du HNE. Le NAC semble favoriser la survie dans plusieurs types cellulaires (Shen et al., 1992;Ratan et al., 1994;Mayer and Noble, 1994). Il peut agir via deux principales voies; soit en se liant aux radicaux libres; soit en augmentant le niveau intracellulaire de GSH (Meister et al., 1986;Aruoma et al., 1989;Staal et al., 1990). Dans la littérature, l'efficacité du NAC à protéger les cellules contre l'apoptose a été démontrée dans un contexte de stress oxydatif. Arakawa et al. ont rapporté que le NAC a un effet protecteur contre l'induction de l'apoptose par le HNE (Arakawa et al., 2006). Nos résultats montrent que le prétraitement avec le NAC permet de contrer l'effet du HNE. En effet, le NAC inhibe l'activation de la caspase-3, -8 et -9, la libération du cytochrome *c* et de l'AIF par la mitochondrie, le clivage de PARP ainsi que la fragmentation de l'ADN. Nous pensons que l'effet bénéfique du NAC dans la prévention de l'apoptose des chondrocytes induite par le HNE est attribuée soit à sa propriété de neutraliser directement le HNE ou soit par son rôle dans la synthèse des antioxydants, à savoir le GSH.

## CONCLUSION

En conclusion, le HNE pourrait jouer un rôle dans l'OA par sa capacité à induire l'apoptose des chondrocytes humains OA. L'induction de l'apoptose semble se produire par l'activation de la voie apoptotique intrinsèque et extrinsèque. Plus précisément le HNE induit l'apoptose des chondrocytes humains OA par l'activation de la caspase-3, -8 et -9 en plus d'induire le relargage de l'AIF et du cytochrome *c* par la mitochondrie. Il favorise la fragmentation de l'ADN et l'activation de la PARP. De plus, il semble que le HNE affecte l'état redox et que l'augmentation du niveau de GST-A4 ou le pré-traitement avec le NAC préviennent ces effets.

# CHAPITRE V: RÉFÉRENCES

## References Cited

- Aderka, D., J. M. Le, and J. Vilcek, 1989, IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice: *J.Immunol.*, v. 143, no. 11, p. 3517-3523.
- Akizuki, S., V. C. Mow, F. Muller, J. C. Pita, D. S. Howell, and D. H. Manicourt, 1986, Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus: *J.Orthop.Res.*, v. 4, no. 4, p. 379-392.
- Alaaeddine, N., J. A. Di Battista, J. P. Pelletier, K. Kiansa, J. M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier, 1999, Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways: *Arthritis Rheum.*, v. 42, no. 4, p. 710-718.
- Altman, F. P., 1976, Tetrazolium salts and formazans: *Prog.Histochem.Cytochem.*, v. 9, no. 3, p. 1-56.
- Altman, R. et al., 1986, 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.*, v. 29, no. 8, p. 1039-1049.
- Arakawa, M., N. Ushimaru, N. Osada, T. Oda, K. Ishige, and Y. Ito, 2006, N-acetylcysteine selectively protects cerebellar granule cells from 4-hydroxynonenal-induced cell death: *Neurosci.Res.*, v. 55, no. 3, p. 255-263.
- Arner, E. C., C. E. Hughes, C. P. Decicco, B. Caterson, and M. D. Tortorella, 1998, Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 6, no. 3, p. 214-228.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, B. M. Hoey, and J. Butler, 1989, The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 6, no. 6, p. 593-597.
- Attur, M. G., M. Dave, C. Cipolletta, P. Kang, M. B. Goldring, I. R. Patel, S. B. Abramson, and A. R. Amin, 2000, Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 51, p. 40307-40315.
- Awasthi, S., S. K. Srivatava, J. T. Piper, S. S. Singhal, M. Chaubey, and Y. C. Awasthi, 1996, Curcumin protects against 4-hydroxy-2-trans-nonenal-induced cataract formation in rat lenses: *Am.J.Clin.Nutr.*, v. 64, no. 5, p. 761-766.
- Awasthi, Y. C., R. Sharma, J. Z. Cheng, Y. Yang, A. Sharma, S. S. Singhal, and S. Awasthi, 2003, Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling: *Mol.Aspects Med.*, v. 24, no. 4-5, p. 219-230.
- Awasthi, Y. C., Y. Yang, N. K. Tiwari, B. Patrick, A. Sharma, J. Li, and S. Awasthi, 2004, Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 37, no. 5, p. 607-619.
- Aydelotte, M. B., R. X. Raiss, B. Caterson, and K. E. Kuettner, 1992, Influence of interleukin-1 on the morphology and proteoglycan metabolism of cultured bovine articular chondrocytes: *Connect.Tissue Res.*, v. 28, no. 1-2, p. 143-159.

- Barrera, G., M. C. Di, R. Muraca, D. Ferrero, G. Cavalli, V. M. Fazio, L. Paradisi, and M. U. Dianzani, 1991, Induction of differentiation in human HL-60 cells by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation: *Exp.Cell Res.*, v. 197, no. 2, p. 148-152.
- Bendele, A. M., and S. L. White, 1987, Early histopathologic and ultrastructural alterations in femorotibial joints of partial medial meniscectomized guinea pigs: *Vet.Pathol.*, v. 24, no. 5, p. 436-443.
- Benedetti, A., M. Comporti, and H. Esterbauer, 1980, Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 620, no. 2, p. 281-296.
- Blanco, F. J., R. Guitian, E. Vazquez-Martul, F. J. de Toro, and F. Galdo, 1998, Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology: *Arthritis Rheum.*, v. 41, no. 2, p. 284-289.
- Blanco, F. J., M. J. Lopez-Armada, and E. Maneiro, 2004, Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis: *Mitochondrion.*, v. 4, no. 5-6, p. 715-728.
- Blanco, F. J., R. L. Ochs, H. Schwarz, and M. Lotz, 1995, Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide: *Am.J.Pathol.*, v. 146, no. 1, p. 75-85.
- Bohm, B. B., T. Aigner, A. Gehrsitz, C. P. Blobel, J. R. Kalden, and H. Burkhardt, 1999, Up-regulation of MDC15 (metargidin) messenger RNA in human osteoarthritic cartilage: *Arthritis Rheum.*, v. 42, no. 9, p. 1946-1950.
- Boisvieux-Ulrich, E., M. Sourdeval, and F. Marano, 2005, CD437, a synthetic retinoid, induces apoptosis in human respiratory epithelial cells via caspase-independent mitochondrial and caspase-8-dependent pathways both up-regulated by JNK signaling pathway: *Exp.Cell Res.*, v. 307, no. 1, p. 76-90.
- Brooks, P. M., 2002, Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications: *Curr.Opin.Rheumatol*, v. 14, no. 5, p. 573-577.
- Buckwalter, J. A., and J. Martin, 1995, Degenerative joint disease: *Clin.Symp.*, v. 47, no. 2, p. 1-32.
- Buckwalter, J. A., J. Martin, and H. J. Mankin, 2000, Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis: *Instr.Course Lect.*, v. 49, p. 481-489.
- Buckwalter, J. A., C. Saltzman, and T. Brown, 2004, The impact of osteoarthritis: implications for research: *Clin.Orthop.Relat Res.*, no. 427 Suppl, p. S6-15.
- Burr, D. B., 1998, The importance of subchondral bone in osteoarthritis: *Curr.Opin.Rheumatol.*, v. 10, no. 3, p. 256-262.
- Burr, D. B., and M. B. Schaffler, 1997, The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: quantitative microscopic evidence: *Microsc.Res.Tech.*, v. 37, no. 4, p. 343-357.
- Cande, C., N. Vahsen, C. Garrido, and G. Kroemer, 2004, Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all: *Cell Death.Differ.*, v. 11, no. 6, p. 591-595.
- Carman, W. J., M. Sowers, V. M. Hawthorne, and L. A. Weissfeld, 1994, Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study: *Am.J.Epidemiol.*, v. 139, no. 2, p. 119-129.

- Cawston, T. E., A. J. Ellis, H. Bigg, V. Curry, E. Lean, and D. Ward, 1996, Interleukin-4 blocks the release of collagen fragments from bovine nasal cartilage treated with cytokines: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1314, no. 3, p. 226-232.
- Celli, A., F. G. Que, G. J. Gores, and N. F. LaRusso, 1998, Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes: *Am.J.Physiol*, v. 275, no. 4 Pt 1, p. G749-G757.
- Chapman, K. et al., 1999, Osteoarthritis-susceptibility locus on chromosome 11q, detected by linkage: *Am.J.Hum.Genet*, v. 65, no. 1, p. 167-174.
- Cheng, J. Z. et al., 2001a, Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 44, p. 41213-41223.
- Cheng, J. Z., S. S. Singhal, M. Saini, J. Singhal, J. T. Piper, F. J. Van Kuijk, P. Zimniak, Y. C. Awasthi, and S. Awasthi, 1999, Effects of mGST A4 transfection on 4-hydroxynonenal-mediated apoptosis and differentiation of K562 human erythroleukemia cells: *Arch.Biochem.Biophys.*, v. 372, no. 1, p. 29-36.
- Cheng, J. Z., S. S. Singhal, A. Sharma, M. Saini, Y. Yang, S. Awasthi, P. Zimniak, and Y. C. Awasthi, 2001b, Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling: *Arch.Biochem.Biophys.*, v. 392, no. 2, p. 197-207.
- Chiarpotto, E. et al., 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*, v. 29, no. 5, p. 1565-1572.
- Chubinskaya, S., G. Cs-Szabo, and K. E. Kuettner, 1998, ADAM-10 message is expressed in human articular cartilage: *J.Histochem.Cytochem.*, v. 46, no. 6, p. 723-729.
- Chubinskaya, S., K. Huch, K. Mikecz, G. Cs-Szabo, K. A. Hasty, K. E. Kuettner, and A. A. Cole, 1996, Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints: *Lab Invest*, v. 74, no. 1, p. 232-240.
- Cleeter, M. W., J. M. Cooper, V. M. rley-USmar, S. Moncada, and A. H. Schapira, 1994, Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases: *FEBS Lett.*, v. 345, no. 1, p. 50-54.
- Cooper, C., H. Inskip, P. Croft, L. Campbell, G. Smith, M. McLaren, and D. Coggon, 1998, Individual risk factors for hip osteoarthritis: obesity, hip injury, and physical activity: *Am.J.Epidemiol.*, v. 147, no. 6, p. 516-522.
- Cooper, C., S. Snow, T. E. McAlindon, S. Kellingray, B. Stuart, D. Coggon, and P. A. Dieppe, 2000, Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis: *Arthritis Rheum.*, v. 43, no. 5, p. 995-1000.
- Cregan, S. P., V. L. Dawson, and R. S. Slack, 2004, Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death: *Oncogene*, v. 23, no. 16, p. 2785-2796.
- Cregan, S. P. et al., 2002, Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death: *J.Cell Biol.*, v. 158, no. 3, p. 507-517.
- Croall, D. E., and G. N. DeMartino, 1991, Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation: *Physiol Rev.*, v. 71, no. 3, p. 813-847.



- Crompton, M., 1999, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death: *Biochem.J.*, v. 341 ( Pt 2), p. 233-249.
- D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva, and G. G. Poirier, 1999, Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions: *Biochem.J.*, v. 342 ( Pt 2), p. 249-268.
- Daugas, E. et al., 2000, Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis: *FASEB J.*, v. 14, no. 5, p. 729-739.
- de, M. G., and M. J. Menissier de, 1994, Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor: *Trends Biochem.Sci.*, v. 19, no. 4, p. 172-176.
- Denizot, F., and R. Lang, 1986, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability: *J.Immunol.Methods*, v. 89, no. 2, p. 271-277.
- Dequeker, J., S. Mohan, R. D. Finkelman, J. Aerssens, and D. J. Baylink, 1993, Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis: *Arthritis Rheum.*, v. 36, no. 12, p. 1702-1708.
- Deshmukh, M., and E. M. Johnson, Jr., 1998, Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c: *Neuron*, v. 21, no. 4, p. 695-705.
- Dianzani, M. U., 2003, 4-hydroxynonenal from pathology to physiology: *Mol.Aspects Med.*, v. 24, no. 4-5, p. 263-272.
- Dianzani, M. U., G. Barrera, and M. Parola, 1999, 4-Hydroxy-2,3-nonenal as a signal for cell function and differentiation: *Acta Biochim.Pol.*, v. 46, no. 1, p. 61-75.
- Dougados, M., A. Gueguen, M. Nguyen, L. Berdah, M. Lequesne, B. Mazieres, and E. Vignon, 1996, Radiological progression of hip osteoarthritis: definition, risk factors and correlations with clinical status: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 55, no. 6, p. 356-362.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang, 2000, Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition: *Cell*, v. 102, no. 1, p. 33-42.
- Dudhia, J., 2005, Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage: *Cell Mol.Life Sci.*, v. 62, no. 19-20, p. 2241-2256.
- Elliott, S. F., C. I. Coon, E. Hays, T. A. Stadheim, and M. P. Vincenti, 2002, Bcl-3 is an interleukin-1-responsive gene in chondrocytes and synovial fibroblasts that activates transcription of the matrix metalloproteinase 1 gene: *Arthritis Rheum.*, v. 46, no. 12, p. 3230-3239.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur, and H. Zollner, 1991, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 11, no. 1, p. 81-128.
- Eyre, D. R., 2004, Collagens and cartilage matrix homeostasis: *Clin.Orthop.Relat Res.*, no. 427 Suppl, p. S118-S122.
- 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.*, v. 52, no. 12, p. 870-875.

Farrell, A. J., D. R. Blake, R. M. Palmer, and S. Moncada, 1992, Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 51, no. 11, p. 1219-1222.

Felson, D. T., N. N. Couropmitree, C. E. Chaisson, M. T. Hannan, Y. Zhang, T. E. McAlindon, M. LaValley, D. Levy, and R. H. Myers, 1998, Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study: *Arthritis Rheum.*, v. 41, no. 6, p. 1064-1071.

Felson, D. T. et al., 2000, Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors: *Ann.Intern.Med.*, v. 133, no. 8, p. 635-646.

Felson, D. T., A. Naimark, J. Anderson, L. Kazis, W. Castelli, and R. F. Meenan, 1987, The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study: *Arthritis Rheum.*, v. 30, no. 8, p. 914-918.

Felson, D. T., Y. Zhang, J. M. Anthony, A. Naimark, and J. J. Anderson, 1992, Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study: *Ann.Intern.Med.*, v. 116, no. 7, p. 535-539.

Felson, D. T., Y. Zhang, M. T. Hannan, A. Naimark, B. Weissman, P. Aliabadi, and D. Levy, 1997, Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study: *Arthritis Rheum.*, v. 40, no. 4, p. 728-733.

Felson, D. T., Y. Zhang, M. T. Hannan, A. Naimark, B. N. Weissman, P. Aliabadi, and D. Levy, 1995, The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study: *Arthritis Rheum.*, v. 38, no. 10, p. 1500-1505.

Fermor, B., J. B. Weinberg, D. S. Pisetsky, M. A. Misukonis, A. J. Banes, and F. Guilak, 2001, The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants: *J.Orthop.Res.*, v. 19, no. 4, p. 729-737.

Fernandes, J. C., J. Martel-Pelletier, and J. P. Pelletier, 2002, The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology: *Biorheology*, v. 39, no. 1-2, p. 237-246.

Ferrari, D., A. Stepczynska, M. Los, S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff, 1998, Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during: *J.Exp.Med.*, v. 188, no. 5, p. 979-984.

Ferrari, G., C. Y. Yan, and L. A. Greene, 1995, N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells: *J.Neurosci.*, v. 15, no. 4, p. 2857-2866.

Fink, K. B. et al., 1999, Reduction of post-traumatic brain injury and free radical production by inhibition of the caspase-1 cascade: *Neuroscience*, v. 94, no. 4, p. 1213-1218.

Finkelstein, E. I., J. Ruben, C. W. Koot, M. Hristova, and d. van, V, 2005, Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the alpha,beta-unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal: *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, v. 289, no. 6, p. L1019-L1028.

Gelber, A. C., M. C. Hochberg, L. A. Mead, N. Y. Wang, F. M. Wigley, and M. J. Klag, 1999, Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis: *Am.J.Med.*, v. 107, no. 6, p. 542-548.

Goggs, R., S. D. Carter, G. Schulze-Tanzil, M. Shakibaei, and A. Mobasheri, 2003, Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis: *Vet.J.*, v. 166, no. 2, p. 140-158.

Goping, I. S., A. Gross, J. N. Lavoie, M. Nguyen, R. Jemmerson, K. Roth, S. J. Korsmeyer, and G. C. Shore, 1998, Regulated targeting of BAX to mitochondria: *J.Cell Biol.*, v. 143, no. 1, p. 207-215.

Green, D. R., and J. C. Reed, 1998, Mitochondria and apoptosis: *Science*, v. 281, no. 5381, p. 1309-1312.

Gross, A., J. Jockel, M. C. Wei, and S. J. Korsmeyer, 1998, Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis: *EMBO J.*, v. 17, no. 14, p. 3878-3885.

Guerne, P. A., B. L. Zuraw, J. H. Vaughan, D. A. Carson, and M. Lotz, 1989, Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis: *J.Clin.Invest*, v. 83, no. 2, p. 585-592.

Guevremont, M., J. Martel-Pelletier, F. Massicotte, G. Tardif, J. P. Pelletier, P. Ranger, D. Lajeunesse, and P. Reboul, 2003, Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HgF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage: *J.Bone Miner.Res.*, v. 18, no. 6, p. 1073-1081.

Guicheux, J., G. Palmer, B. Relic, F. Mezin, J. Caverzasio, P. Apostolides, J. F. Gauchat, C. Gabay, and P. A. Guerne, 2002, Primary human articular chondrocytes, dedifferentiated chondrocytes, and synoviocytes exhibit differential responsiveness to interleukin-4: correlation with the expression pattern of the common receptor gamma chain: *J.Cell Physiol*, v. 192, no. 1, p. 93-101.

Hammer, A., M. Ferro, H. M. Tillian, F. Tatzber, H. Zollner, E. Schauenstein, and R. J. Schaur, 1997, Effect of oxidative stress by iron on 4-hydroxynonenal formation and proliferative activity in hepatomas of different degrees of differentiation: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 23, no. 1, p. 26-33.

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.*, v. 34, no. 2, p. 153-163.

Hashimoto, S., R. L. Ochs, S. Komiya, and M. Lotz, 1998a, Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis: *Arthritis Rheum.*, v. 41, no. 9, p. 1632-1638.

Hashimoto, S., K. Takahashi, D. Amiel, R. D. Coutts, and M. Lotz, 1998b, Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis: *Arthritis Rheum.*, v. 41, no. 7, p. 1266-1274.

Henrotin, Y., B. Kurz, and T. Aigner, 2005, Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 13, no. 8, p. 643-654.

Henrotin, Y. E., P. Bruckner, and J. P. Pujol, 2003, The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 11, no. 10, p. 747-755.

Hochberg, M. C., M. Lethbridge-Cejku, W. W. Scott, Jr., C. C. Plato, and J. D. Tobin, 1993, Obesity and osteoarthritis of the hands in women: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 1, no. 2, p. 129-135.

Hollander, A. P., I. Pidoux, A. Reiner, C. Rorabeck, R. Bourne, and A. R. Poole, 1995, Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration: *J.Clin.Invest*, v. 96, no. 6, p. 2859-2869.

- Hu, S., S. J. Snipas, C. Vincenz, G. Salvesen, and V. M. Dixit, 1998, Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 45, p. 29648-29653.
- Hulth, A., L. Lindberg, and H. Telhag, 1972, Mitosis in human osteoarthritic cartilage: *Clin.Orthop.Relat Res.*, v. 84, p. 197-199.
- Hunter, D. J., and D. T. Felson, 2006, Osteoarthritis: *BMJ*, v. 332, no. 7542, p. 639-642.
- Iannone, F., B. C. De, F. Dell'Accio, M. Covelli, F. P. Cantatore, V. Patella, B. G. Lo, and G. Lapadula, 2001, Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes: *Clin.Exp.Rheumatol.*, v. 19, no. 2, p. 139-145.
- Ilic, M. Z., C. J. Handley, H. C. Robinson, and M. T. Mok, 1992, Mechanism of catabolism of aggrecan by articular cartilage: *Arch.Biochem.Biophys.*, v. 294, no. 1, p. 115-122.
- Imai, K., S. Ohta, T. Matsumoto, N. Fujimoto, H. Sato, M. Seiki, and Y. Okada, 1997, Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage: *Am.J.Pathol.*, v. 151, no. 1, p. 245-256.
- Imhof, H., M. Breitscheher, F. Kainberger, T. Rand, and S. Trattnig, 1999, Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease: *Top.Magn Reson.Imaging*, v. 10, no. 3, p. 180-192.
- Ingvarsson, T. et al., 2000, The inheritance of hip osteoarthritis in Iceland: *Arthritis Rheum.*, v. 43, no. 12, p. 2785-2792.
- Isomaki, P., and J. Punnonen, 1997, Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis: *Ann.Med.*, v. 29, no. 6, p. 499-507.
- Ji, C., V. Amarnath, J. A. Pietenpol, and L. J. Marnett, 2001, 4-hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release: *Chem.Res.Toxicol.*, v. 14, no. 8, p. 1090-1096.
- Johnson, K., A. Jung, A. Murphy, A. Andreyev, J. Dykens, and R. Terkeltaub, 2000, Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization: *Arthritis Rheum.*, v. 43, no. 7, p. 1560-1570.
- Jonsson, H., I. Manolescu, S. E. Stefansson, T. Ingvarsson, H. H. Jonsson, A. Manolescu, J. Gulcher, and K. Stefansson, 2003, The inheritance of hand osteoarthritis in Iceland: *Arthritis Rheum.*, v. 48, no. 2, p. 391-395.
- Jovanovic, D., J. P. Pelletier, N. Alaaeddine, F. Mineau, C. Geng, P. Ranger, and J. Martel-Pelletier, 1998, Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 6, no. 1, p. 40-49.
- Joza, N. et al., 2001, Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death: *Nature*, v. 410, no. 6828, p. 549-554.
- Kaprio, J., U. M. Kujala, L. Peltonen, and M. Koskenvuo, 1996, Genetic liability to osteoarthritis may be greater in women than men: *BMJ*, v. 313, no. 7051, p. 232.
- Karlsen, E. W., L. A. Mandl, G. N. Aweh, O. Sangha, M. H. Liang, and F. Grodstein, 2003, Total hip replacement due to osteoarthritis: the importance of age, obesity, and other modifiable risk factors: *Am.J.Med.*, v. 114, no. 2, p. 93-98.

- Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson, and G. G. Poirier, 1993, Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis: *Cancer Res.*, v. 53, no. 17, p. 3976-3985.
- Keene, D. R., E. Engvall, and R. W. Glanville, 1988, Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network: *J.Cell Biol.*, v. 107, no. 5, p. 1995-2006.
- Kehe, K., K. Raithel, H. Kreppel, M. Jochum, F. Worek, and H. Thiermann, 2007, Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) influences the mode of sulfur mustard (SM)-induced cell death in HaCaT cells: *Arch.Toxicol.*
- Kellgren, J. H., and R. Moore, 1952, Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes: *Br.Med.J.*, v. 1, no. 4751, p. 181-187.
- Kempson, G. E., H. Muir, C. Pollard, and M. Tuke, 1973, The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 297, no. 2, p. 456-472.
- Kim, H. A., Y. J. Lee, S. C. Seong, K. W. Choe, and Y. W. Song, 2000, Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis: *J.Rheumatol*, v. 27, no. 2, p. 455-462.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green, and D. D. Newmeyer, 1997, The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis: *Science*, v. 275, no. 5303, p. 1132-1136.
- Kouri, J. B., and C. Lavalle, 2006, Do chondrocytes undergo "activation" and "transdifferentiation" during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the ultrastructural and immunohistochemical evidence: *Histol.Histopathol.*, v. 21, no. 7, p. 793-802.
- Kreuzer, T., R. Grube, A. Wutte, N. Zarkovic, and R. J. Schaur, 1998, 4-Hydroxynonenal modifies the effects of serum growth factors on the expression of the c-fos proto-oncogene and the proliferation of HeLa carcinoma cells: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 25, no. 1, p. 42-49.
- Kroemer, G., N. Zamzami, and S. A. Susin, 1997, Mitochondrial control of apoptosis: *Immunol.Today*, v. 18, no. 1, p. 44-51.
- Krohn, A. J., E. Preis, and J. H. Prehn, 1998, Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector: *J.Neurosci.*, v. 18, no. 20, p. 8186-8197.
- Kruman, I., A. J. Bruce-Keller, D. Bredesen, G. Waeg, and M. P. Mattson, 1997, Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis: *J.Neurosci.*, v. 17, no. 13, p. 5089-5100.
- Kuettner, K. E., and A. A. Cole, 2005, Cartilage degeneration in different human joints: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 13, no. 2, p. 93-103.
- Kumagai, T., N. Matsukawa, Y. Kaneko, Y. Kusumi, M. Mitsumata, and K. Uchida, 2004, A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages: *J.Biol.Chem.*, v. 279, no. 46, p. 48389-48396.
- Kutuk, O., G. Poli, and H. Basaga, 2006, Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling: *Toxicol.Sci.*, v. 90, no. 1, p. 120-132.

- Lajeunesse, D., G. Hilal, J. P. Pelletier, and J. Martel-Pelletier, 1999, Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 7, no. 3, p. 321-322.
- Lajeunesse, D., and P. Reboul, 2003, Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling: *Curr.Opin.Rheumatol*, v. 15, no. 5, p. 628-633.
- Lane, N. E., L. R. Gore, S. R. Cummings, M. C. Hochberg, J. C. Scott, E. N. Williams, and M. C. Nevitt, 1999, Serum vitamin D levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: a longitudinal study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group: *Arthritis Rheum.*, v. 42, no. 5, p. 854-860.
- Lanyon, P., K. Muir, S. Doherty, and M. Doherty, 2000, Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study: *BMJ*, v. 321, no. 7270, p. 1179-1183.
- Lautier, D., J. Lagueux, J. Thibodeau, L. Menard, and G. G. Poirier, 1993, Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism: *Mol.Cell Biochem.*, v. 122, no. 2, p. 171-193.
- Lawrence, J. S., J. M. Bremner, and F. Bier, 1966, Osteo-arthritis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 25, no. 1, p. 1-24.
- Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, and W. C. Earnshaw, 1994, Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE: *Nature*, v. 371, no. 6495, p. 346-347.
- Ledingham, J., S. Dawson, B. Preston, G. Milligan, and M. Doherty, 1993, Radiographic progression of hospital referred osteoarthritis of the hip: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 52, no. 4, p. 263-267.
- Lee, H. C., P. H. Yin, C. Y. Lu, C. W. Chi, and Y. H. Wei, 2000, Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells: *Biochem.J.*, v. 348 Pt 2, p. 425-432.
- Lee, J. Y. et al., 2004, Induction of endothelial apoptosis by 4-hydroxyhexenal: *Eur.J.Biochem.*, v. 271, no. 7, p. 1339-1347.
- Leigh, J. P., W. Seavey, and B. Leistikow, 2001, Estimating the costs of job related arthritis: *J.Rheumatol*, v. 28, no. 7, p. 1647-1654.
- Leist, M., B. Single, A. F. Castoldi, S. Kuhnle, and P. Nicotera, 1997, Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis: *J.Exp.Med.*, v. 185, no. 8, p. 1481-1486.
- Leonarduzzi, G., F. Robbesyn, and G. Poli, 2004, Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 37, no. 11, p. 1694-1702.
- Lequesne, M. G., N. Dang, and N. E. Lane, 1997, Sport practice and osteoarthritis of the limbs: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 5, no. 2, p. 75-86.
- Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang, 2001, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria: *Nature*, v. 412, no. 6842, p. 95-99.
- Li, W. Q., H. Y. Qureshi, A. Liacini, F. Dehnade, and M. Zafarullah, 2004, Transforming growth factor Beta1 induction of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 37, no. 2, p. 196-207.

- Liacini, A., J. Sylvester, W. Q. Li, W. Huang, F. Dehnade, M. Ahmad, and M. Zafarullah, 2003, Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes: *Exp.Cell Res.*, v. 288, no. 1, p. 208-217.
- Lievensse, A. M., S. M. Bierma-Zeinstra, A. P. Verhagen, R. M. Bernsen, J. A. Verhaar, and B. W. Koes, 2003, Influence of sporting activities on the development of osteoarthritis of the hip: a systematic review: *Arthritis Rheum.*, v. 49, no. 2, p. 228-236.
- Lindblad, S., and E. Hedfors, 1987, Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis: *Arthritis Rheum.*, v. 30, no. 10, p. 1081-1088.
- Liu, W. et al., 2000a, 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death: *J.Cell Sci.*, v. 113 ( Pt 4), p. 635-641.
- Liu, Z., C. Sun, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. F. Betz, T. Oost, J. Herrmann, J. C. Wu, and S. W. Fesik, 2000b, Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain: *Nature*, v. 408, no. 6815, p. 1004-1008.
- Lo, Y. Y., J. A. Conquer, S. Grinstein, and T. F. Cruz, 1998, Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species: *J.Cell Biochem.*, v. 69, no. 1, p. 19-29.
- Loeffler, M., and G. Kroemer, 2000, The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita: *Exp.Cell Res.*, v. 256, no. 1, p. 19-26.
- Lopez-Armada, M. J., B. Carames, M. Lires-Dean, B. Cillero-Pastor, C. Ruiz-Romero, F. Galdo, and F. J. Blanco, 2006, Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 14, no. 7, p. 660-669.
- Lotz, M., F. J. Blanco, K. J. von, J. Dudler, R. Maier, P. M. Villiger, and Y. Geng, 1995, Cytokine regulation of chondrocyte functions: *J.Rheumatol Suppl*, v. 43, p. 104-108.
- Lotz, M., and P. A. Guerne, 1991, Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA): *J.Biol.Chem.*, v. 266, no. 4, p. 2017-2020.
- Lotz, M., S. Hashimoto, and K. Kuhn, 1999, Mechanisms of chondrocyte apoptosis: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 7, no. 4, p. 389-391.
- Loulakis, P., A. Shrikhande, G. Davis, and C. A. Maniglia, 1992, N-terminal sequence of proteoglycan fragments isolated from medium of interleukin-1-treated articular-cartilage cultures. Putative site(s) of enzymic cleavage: *Biochem.J.*, v. 284 ( Pt 2), p. 589-593.
- Lubberts, E., L. A. Joosten, F. A. van de Loo, L. A. van den Gersselaar, and W. B. Van Den Berg, 2000a, Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4: *Arthritis Rheum.*, v. 43, no. 6, p. 1300-1306.
- Lubberts, E., L. A. Joosten, B. L. Van Den, M. M. Helsen, A. C. Bakker, Z. Xing, C. D. Richards, and W. B. Van Den Berg, 2000b, Intra-articular IL-10 gene transfer regulates the expression of collagen-induced arthritis (CIA) in the knee and ipsilateral paw: *Clin.Exp.Immunol.*, v. 120, no. 2, p. 375-383.
- Lust, G., and B. A. Summers, 1981, Early, asymptomatic stage of degenerative joint disease in canine hip joints: *Am.J.Vet.Res.*, v. 42, no. 11, p. 1849-1855.

- MacGregor, A. J., L. Antoniadou, M. Matson, T. Andrew, and T. D. Spector, 2000, The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: results of a classic twin study: *Arthritis Rheum.*, v. 43, no. 11, p. 2410-2416.
- Majno, G., and I. Joris, 1995, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death: *Am.J.Pathol.*, v. 146, no. 1, p. 3-15.
- 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.*, v. 53, no. 3, p. 523-537.
- Maroudas, A., H. Muir, and J. Wingham, 1969, The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 177, no. 3, p. 492-500.
- Martel-Pelletier, J., 2004, Pathophysiology of osteoarthritis: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 12 Suppl A, p. S31-S33.
- Martel-Pelletier, J., 1999, Pathophysiology of osteoarthritis: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 7, no. 4, p. 371-373.
- 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.*, v. 35, no. 5, p. 530-540.
- Martins, L. M. et al., 2002, The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 1, p. 439-444.
- Mayer, M., and M. Noble, 1994, N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 91, no. 16, p. 7496-7500.
- McInnes, I. B. et al., 1996, Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients: *J.Exp.Med.*, v. 184, no. 4, p. 1519-1524.
- McKeague, A. L., D. J. Wilson, and J. Nelson, 2003, Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines: *Br.J.Cancer*, v. 88, no. 1, p. 125-131.
- Meachim, G., and D. H. Collins, 1962, Cell counts of normal and osteoarthritic articular cartilage in relation to the uptake of sulphate ( $^{35}\text{SO}_4$ ) in vitro: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 21, p. 45-50.
- Meister, A., 1988, Glutathione metabolism and its selective modification: *J.Biol.Chem.*, v. 263, no. 33, p. 17205-17208.
- Meister, A., M. E. Anderson, and O. Hwang, 1986, Intracellular cysteine and glutathione delivery systems: *J.Am.Coll.Nutr.*, v. 5, no. 2, p. 137-151.
- 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.*, v. 43, no. 4, p. 801-811.
- Merad-Boudia, M., A. Nicole, D. Santiard-Baron, C. Saille, and I. Ceballos-Picot, 1998, Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione



depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease: *Biochem.Pharmacol.*, v. 56, no. 5, p. 645-655.

Middleton, J., A. Manthey, and J. Tyler, 1996, Insulin-like growth factor (IGF) receptor, IGF-I, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-6 mRNA expression in osteoarthritic and normal human cartilage: *J.Histochem.Cytochem.*, v. 44, no. 2, p. 133-141.

Mital, M. A., and P. F. Millington, 1970, Osseous pathway of nutrition to articular cartilage of the human femoral head: *Lancet*, v. 1, no. 7651, p. 842.

Mitchell, P. G., H. A. Magna, L. M. Reeves, L. L. Lopresti-Morrow, S. A. Yocum, P. J. Rosner, K. F. Geoghegan, and J. E. Hambor, 1996, Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage: *J.Clin.Invest*, v. 97, no. 3, p. 761-768.

Montine, K. S., S. J. Olson, V. Amarnath, W. O. Whetsell, Jr., D. G. Graham, and T. J. Montine, 1997, Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of APOE4: *Am.J.Pathol.*, v. 150, no. 2, p. 437-443.

Moo, V., J. Sieper, V. Herzog, and B. M. Muller, 2001, Regulation of expression of cytokines and growth factors in osteoarthritic cartilage explants: *Clin.Rheumatol.*, v. 20, no. 5, p. 353-358.

Moos, V., S. Fickert, B. Muller, U. Weber, and J. Sieper, 1999, Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage: *J.Rheumatol.*, v. 26, no. 4, p. 870-879.

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.*, v. 54, no. 1, p. 271-281.

Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays: *J.Immunol.Methods*, v. 65, no. 1-2, p. 55-63.

Murrell, G. A., D. Jang, and R. J. Williams, 1995, Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 206, no. 1, p. 15-21.

Myers, S. L., K. D. Brandt, J. W. Ehlich, E. M. Braunstein, K. D. Shelbourne, D. A. Heck, and L. A. Kalasinski, 1990, Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee: *J.Rheumatol.*, v. 17, no. 12, p. 1662-1669.

Nicotera, P., M. Leist, and E. Ferrando-May, 1998, Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis: *Toxicol.Lett.*, v. 102-103, p. 139-142.

Nicotera, P., and G. Melino, 2004, Regulation of the apoptosis-necrosis switch: *Oncogene*, v. 23, no. 16, p. 2757-2765.

Nietfeld, J. J., B. Wilbrink, M. Helle, J. L. van Roy, O. W. den, A. J. Swaak, and O. Huber-Bruning, 1990, Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage: *Arthritis Rheum.*, v. 33, no. 11, p. 1695-1701.

Notoya, K., D. V. Jovanovic, P. Reboul, J. Martel-Pelletier, F. Mineau, and J. P. Pelletier, 2000, The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2: *J.Immunol.*, v. 165, no. 6, p. 3402-3410.

- Ohta, S., K. Imai, K. Yamashita, T. Matsumoto, I. Azumano, and Y. Okada, 1998, Expression of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human osteoarthritic cartilage: *Lab Invest*, v. 78, no. 1, p. 79-87.
- Oliveria, S. A., D. T. Felson, P. A. Cirillo, J. I. Reed, and A. M. Walker, 1999, Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee: *Epidemiology*, v. 10, no. 2, p. 161-166.
- Oliveria, S. A., D. T. Felson, J. I. Reed, P. A. Cirillo, and A. M. Walker, 1995, Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization: *Arthritis Rheum.*, v. 38, no. 8, p. 1134-1141.
- Pelletier, J. P., J. Martel-Pelletier, and S. B. Abramson, 2001, Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets: *Arthritis Rheum.*, v. 44, no. 6, p. 1237-1247.
- Peristeris, P., B. D. Clark, S. Gatti, R. Faggioni, A. Mantovani, M. Mengozzi, S. F. Orencole, M. Sironi, and P. Ghezzi, 1992, N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production: *Cell Immunol.*, v. 140, no. 2, p. 390-399.
- Petit, P. X., H. Lecoecur, E. Zorn, C. Dauguet, B. Mignotte, and M. L. Gougeon, 1995, Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: *J.Cell Biol.*, v. 130, no. 1, p. 157-167.
- Petit, P. X., N. Zamzami, J. L. Vayssiere, B. Mignotte, G. Kroemer, and M. Castedo, 1997, Implication of mitochondria in apoptosis: *Mol.Cell Biochem.*, v. 174, no. 1-2, p. 185-188.
- Piperno, M., P. Reboul, M. P. Hellio le Graverand, M. Peschard, M. Anfeld, M. Richard, and E. Vignon, 1998, Osteoarthritic cartilage fibrillation is associated with a decrease in chondrocyte adhesion to fibronectin: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 6, no. 6, p. 393-399.
- Plows, D., L. Probert, S. Georgopoulos, L. Alexopoulou, and G. Kollias, 1995, The role of tumour necrosis factor (TNF) in arthritis: studies in transgenic mice.: *Rheumatol Eur*, v. Suppl 2, p. 51-54.
- Poole, A. R., T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Lavery, 2001, Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair: *Clin.Orthop.Relat Res.*, no. 391 Suppl, p. S26-S33.
- Poole, A. R., I. Pidoux, A. Reiner, and L. Rosenberg, 1982, An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage: *J.Cell Biol.*, v. 93, no. 3, p. 921-937.
- Poole, A. R., I. Pidoux, A. Reiner, L. H. Tang, H. Choi, and L. Rosenberg, 1980, Localization of proteoglycan monomer and link protein in the matrix of bovine articular cartilage: An immunohistochemical study: *J.Histochem.Cytochem.*, v. 28, no. 7, p. 621-635.
- Poole, A. R., C. Webber, I. Pidoux, H. Choi, and L. C. Rosenberg, 1986, Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues: *J.Histochem.Cytochem.*, v. 34, no. 5, p. 619-625.
- Rabacchi, S. A., W. J. Friedman, M. L. Shelanski, and C. M. Troy, 2004, Divergence of the apoptotic pathways induced by 4-hydroxynonenal and amyloid beta-protein: *Neurobiol.Aging*, v. 25, no. 8, p. 1057-1066.

- Ramachandran, V., A. Perez, J. Chen, D. Senthil, S. Schenker, and G. I. Henderson, 2001, In utero ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction, which can result in apoptotic cell death in fetal brain: a potential role for 4-hydroxynonenal: *Alcohol Clin.Exp.Res.*, v. 25, no. 6, p. 862-871.
- Ratan, R. R., T. H. Murphy, and J. M. Baraban, 1994, Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione: *J.Neurosci.*, v. 14, no. 7, p. 4385-4392.
- Raza, H., and A. John, 2006, 4-hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells: *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, v. 216, no. 2, p. 309-318.
- Reboul, P., J. P. Pelletier, G. Tardif, J. M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier, 1996, The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis: *J.Clin.Invest.*, v. 97, no. 9, p. 2011-2019.
- Reginster, J. Y., 2002, The prevalence and burden of arthritis: *Rheumatology.(Oxford)*, v. 41 Suppl 1, p. 3-6.
- Rothwell, A. G., and G. Bentley, 1973, Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage: *J.Bone Joint Surg.Br.*, v. 55, no. 3, p. 588-594.
- 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*, v. 97, no. 11, p. 1071-1078.
- Ruffolo, S. C., D. G. Breckenridge, M. Nguyen, I. S. Goping, A. Gross, S. J. Korsmeyer, H. Li, J. Yuan, and G. C. Shore, 2000, BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria: *Cell Death.Differ.*, v. 7, no. 11, p. 1101-1108.
- Salter, D. M., G. Nuki, and M. O. Wright, 1996, IL-4 inhibition of cartilage breakdown in bovine articular explants: *J.Rheumatol.*, v. 23, no. 7, p. 1314-1315.
- Sandy, J. D., P. J. Neame, R. E. Boynton, and C. R. Flannery, 1991, Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain: *J.Biol.Chem.*, v. 266, no. 14, p. 8683-8685.
- Sarzi-Puttini, P., M. A. Cimmino, R. Scarpa, R. Caporali, F. Parazzini, A. Zaninelli, F. Atzeni, and B. Canesi, 2005, Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies: *Semin.Arthritis Rheum.*, v. 35, no. 1 Suppl 1, p. 1-10.
- Sasaki, K., T. Hattori, T. Fujisawa, K. Takahashi, H. Inoue, and M. Takigawa, 1998, Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes: *J.Biochem.(Tokyo)*, v. 123, no. 3, p. 431-439.
- Sayre, L. M., D. A. Zelasko, P. L. Harris, G. Perry, R. G. Salomon, and M. A. Smith, 1997, 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease: *J.Neurochem.*, v. 68, no. 5, p. 2092-2097.
- Schauenstein, E., and H. Esterbauer, 1978, Formation and properties of reactive aldehydes: *Ciba Found.Symp.*, no. 67, p. 225-244.
- Schaur, R. J., 2003, Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal: *Mol.Aspects Med.*, v. 24, no. 4-5, p. 149-159.

- Schouten, J. S., F. A. van den Ouweland, and H. A. Valkenburg, 1992, A 12 year follow up study in the general population on prognostic factors of cartilage loss in osteoarthritis of the knee: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 51, no. 8, p. 932-937.
- Shall, S., and M. G. de, 2000, Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?: *Mutat.Res.*, v. 460, no. 1, p. 1-15.
- Shen, W., L. M. Kamendulis, S. D. Ray, and G. B. Corcoran, 1992, Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca(2+)-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death: *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, v. 112, no. 1, p. 32-40.
- Shingu, M., S. Miyauchi, Y. Nagai, C. Yasutake, and K. Horie, 1995, The role of IL-4 and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation: *Br.J.Rheumatol.*, v. 34, no. 2, p. 101-106.
- Shlopov, B. V., W. R. Lie, C. L. Mainardi, A. A. Cole, S. Chubinskaya, and K. A. Hasty, 1997, Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases: *Arthritis Rheum.*, v. 40, no. 11, p. 2065-2074.
- Siems, W., and T. Grune, 2003, Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal: *Mol.Aspects Med.*, v. 24, no. 4-5, p. 167-175.
- Simon, L. S., 1999, Osteoarthritis: a review: *Clin.Cornerstone.*, v. 2, no. 2, p. 26-37.
- Sokoloff, L., 1993, Microcracks in the calcified layer of articular cartilage: *Arch.Pathol.Lab Med.*, v. 117, no. 2, p. 191-195.
- Spector, T. D., F. Cicuttini, J. Baker, J. Loughlin, and D. Hart, 1996, Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study: *BMJ*, v. 312, no. 7036, p. 940-943.
- Spector, T. D., D. J. Hart, and D. V. Doyle, 1994, Incidence and progression of osteoarthritis in women with unilateral knee disease in the general population: the effect of obesity: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 53, no. 9, p. 565-568.
- Staal, F. J., M. Roederer, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg, 1990, Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 87, no. 24, p. 9943-9947.
- Stadler, J., M. Stefanovic-Racic, T. R. Billiar, R. D. Curran, L. A. McIntyre, H. I. Georgescu, R. L. Simmons, and C. H. Evans, 1991, Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide: *J.Immunol.*, v. 147, no. 11, p. 3915-3920.
- Stahle-Backdahl, M., B. Sandstedt, K. Bruce, A. Lindahl, M. G. Jimenez, J. A. Vega, and C. Lopez-Otin, 1997, Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis: *Lab Invest*, v. 76, no. 5, p. 717-728.
- Stefanis, L., D. S. Park, C. Y. Yan, S. E. Farinelli, C. M. Troy, M. L. Shelanski, and L. A. Greene, 1996, Induction of CPP32-like activity in PC12 cells by withdrawal of trophic support. Dissociation from apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 271, no. 48, p. 30663-30671.
- Sternlicht, M. D., and Z. Werb, 2001, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior: *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, v. 17, p. 463-516.
- Stockwell, R. A., 1971, The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage: *J.Anat.*, v. 109, no. Pt 3, p. 411-421.

Stremme, S., S. Duerr, B. Bau, E. Schmid, and T. Aigner, 2003, MMP-8 is only a minor gene product of human adult articular chondrocytes of the knee: *Clin.Exp.Rheumatol*, v. 21, no. 2, p. 205-209.

Susin, S. A. et al., 2000, Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis: *J.Exp.Med.*, v. 192, no. 4, p. 571-580.

Susin, S. A. et al., 1999, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor: *Nature*, v. 397, no. 6718, p. 441-446.

Suzuki, K., K. Shimizu, T. Hamamoto, Y. Nakagawa, T. Hamakubo, and T. Yamamuro, 1990, Biochemical demonstration of calpains and calpastatin in osteoarthritic synovial fluid: *Arthritis Rheum.*, v. 33, no. 5, p. 728-732.

Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio, and R. Takahashi, 2001, A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death: *Mol.Cell*, v. 8, no. 3, p. 613-621.

Szomor, Z., K. Shimizu, Y. Fujimori, S. Yamamoto, and T. Yamamuro, 1995, Appearance of calpain correlates with arthritis and cartilage destruction in collagen induced arthritic knee joints of mice: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 54, no. 6, p. 477-483.

Taskiran, D., M. Stefanovic-Racic, H. Georgescu, and C. Evans, 1994, Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 200, no. 1, p. 142-148.

Tiku, M. L., G. T. Allison, K. Naik, and S. K. Karry, 2003, Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 11, no. 3, p. 159-166.

Tiku, M. L., J. B. Liesch, and F. M. Robertson, 1990, Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines: *J.Immunol.*, v. 145, no. 2, p. 690-696.

Troy, C. M., S. A. Rabacchi, W. J. Friedman, T. F. Frappier, K. Brown, and M. L. Shelanski, 2000, Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid: *J.Neurosci.*, v. 20, no. 4, p. 1386-1392.

Troy, C. M., S. A. Rabacchi, J. B. Hohl, J. M. Angelastro, L. A. Greene, and M. L. Shelanski, 2001, Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation: *J.Neurosci.*, v. 21, no. 14, p. 5007-5016.

Twentyman, P. R., and M. Luscombe, 1987, A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity: *Br.J.Cancer*, v. 56, no. 3, p. 279-285.

Uchida, K., 2003, 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress: *Prog.Lipid Res.*, v. 42, no. 4, p. 318-343.

Uchida, K., and T. Kumagai, 2003, 4-hydroxy-2-nonenal as a COX-2 inducer: *Mol.Aspects Med.*, v. 24, no. 4-5, p. 213-218.

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.*, v. 274, no. 4, p. 2234-2242.

Uchida, K., S. Toyokuni, K. Nishikawa, S. Kawakishi, H. Oda, H. Hiai, and E. R. Stadtman, 1994, Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis: *Biochemistry*, v. 33, no. 41, p. 12487-12494.

van de Loo, F. A., L. A. Joosten, P. L. van Lent, O. J. Arntz, and W. B. Van Den Berg, 1995, Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis: *Arthritis Rheum.*, v. 38, no. 2, p. 164-172.

Van de, C. M., W. Declercq, d. b. Van, I, W. Fiers, and P. Vandenabeele, 1999, The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis: *Cell Death.Differ.*, v. 6, no. 11, p. 1117-1124.

van Roon, J. A., F. P. Lafeber, and J. W. Bijlsma, 2001, Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis: *Arthritis Rheum.*, v. 44, no. 1, p. 3-12.

van, L. G. et al., 2001, Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation: *Cell Death.Differ.*, v. 8, no. 12, p. 1136-1142.

Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, X. X. Li, P. T. Schumacker, M. Colombini, and C. B. Thompson, 2000, Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 97, no. 9, p. 4666-4671.

Vayssiere, J. L., P. X. Petit, Y. Risler, and B. Mignotte, 1994, Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 91, no. 24, p. 11752-11756.

Venn, M., and A. Maroudas, 1977, Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 36, no. 2, p. 121-129.

Venn, M. F., 1978, Variation of chemical composition with age in human femoral head cartilage: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 37, no. 2, p. 168-174.

Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, and D. L. Vaux, 2000, Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins: *Cell*, v. 102, no. 1, p. 43-53.

Vincenti, M. P., and C. E. Brinckerhoff, 2002, Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors: *Arthritis Res.*, v. 4, no. 3, p. 157-164.

Vingard, E., L. Alfredsson, and H. Malchau, 1997, Lifestyle factors and hip arthrosis. A case referent study of body mass index, smoking and hormone therapy in 503 Swedish women: *Acta Orthop.Scand.*, v. 68, no. 3, p. 216-220.

Virag, L., and C. Szabo, 2002, The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors: *Pharmacol.Rev.*, v. 54, no. 3, p. 375-429.

Wang, Y., and S. Lou, 2001, Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro: *Chin Med.J.(Engl.)*, v. 114, no. 7, p. 723-725.

Weiss, C., and S. Mirow, 1972, An ultrastructural study of osteoarthritis changes in the articular cartilage of human knees: *J.Bone Joint Surg.Am.*, v. 54, no. 5, p. 954-972.

Westacott, C. I., G. R. Webb, M. G. Warnock, J. V. Sims, and C. J. Elson, 1997, Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone: *Arthritis Rheum.*, v. 40, no. 7, p. 1282-1291.

Wright, G. D., A. E. Hughes, M. Regan, and M. Doherty, 1996, Association of two loci on chromosome 2q with nodal osteoarthritis: *Ann.Rheum.Dis.*, v. 55, no. 5, p. 317-319.

Yamamoto, S., K. Shimizu, K. Shimizu, K. Suzuki, Y. Nakagawa, and T. Yamamuro, 1992, Calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in human arthritic synovial joints: *Arthritis Rheum.*, v. 35, no. 11, p. 1309-1317.

Yang, Y., A. Sharma, R. Sharma, B. Patrick, S. S. Singhal, P. Zimniak, S. Awasthi, and Y. C. Awasthi, 2003, Cells preconditioned with mild, transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis: role of 4-hydroxynonenal in UVA-mediated signaling for apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 42, p. 41380-41388.

Yang, Y., Y. Yang, M. B. Trent, N. He, S. D. Lick, P. Zimniak, Y. C. Awasthi, and P. J. Boor, 2004, Glutathione-S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis: *Atherosclerosis*, v. 173, no. 2, p. 211-221.

Ye, H. et al., 2002, DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor: *Nat.Struct.Biol.*, v. 9, no. 9, p. 680-684.

Yoshimura, F., H. Kanno, M. Uzuki, K. Tajima, T. Shimamura, and T. Sawai, 2006, Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D: *Osteoarthritis.Cartilage.*, v. 14, no. 5, p. 435-441.

Yu, S. W., H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson, and V. L. Dawson, 2002, Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor: *Science*, v. 297, no. 5579, p. 259-263.

Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J. L. Vayssiere, P. X. Petit, and G. Kroemer, 1995, Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo: *J.Exp.Med.*, v. 181, no. 5, p. 1661-1672.

Zarkovic, N., Z. Ilic, M. Jurin, R. J. Schaur, H. Puhl, and H. Esterbauer, 1993, Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal: *Cell Biochem.Funct.*, v. 11, no. 4, p. 279-286.

Zarkovic, N., M. H. Tillian, J. Schaur, G. Waeg, M. Jurin, and H. Esterbauer, 1995, Inhibition of melanoma B16-F10 growth by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal: *Cancer Biother.*, v. 10, no. 2, p. 153-156.

Zhang, W., Q. He, L. L. Chan, F. Zhou, N. M. El, E. B. Thompson, and N. H. Ansari, 2001, Involvement of caspases in 4-hydroxy-alkenal-induced apoptosis in human leukemic cells: *Free Radic.Biol.Med.*, v. 30, no. 6, p. 699-706.

Zhang, Y., T. E. McAlindon, M. T. Hannan, C. E. Chaisson, R. Klein, P. W. Wilson, and D. T. Felson, 1998, Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study: *Arthritis Rheum.*, v. 41, no. 10, p. 1867-1873.