

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

**LE RÔLE DE LA CATHEPSINE K DANS LE
DÉVELOPPEMENT DE L'OSTÉOARTHROSE
ÉQUINE**

par

Tatiana VINARDELL, DMV, IPSAV

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)
en sciences vétérinaires
option sciences cliniques

Décembre 2007

© Tatiana Vinardell, 2007



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**LE RÔLE DE LA CATHEPSINE K DANS LE
DÉVELOPPEMENT DE L'OSTÉOARTHROSE
ÉQUINE**

présenté par :

Tatiana VINARDELL, DMV, IPSAV

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christine Théorêt, présidente-rapporteuse

Sheila Lavery, directrice de recherche

A. Robin Poole, codirecteur

Bruce D. Murphy, membre du jury

Résumé

Un des événements irréversibles dans le développement de l'ostéoartrrose (OA) est la dégradation enzymatique des fibres de collagène de type II. Les dernières études suggèrent que les principaux acteurs dans ce processus sont les collagénases (MMP-1 et MMP-13). Il a été démontré récemment que la cathepsin K (CK), dégrade également la triple hélice de collagène. Cette dégradation spécifique produit un néoépitope qui peut être identifié par des anticorps. Le but de cette étude est d'étudier le rôle de la CK chez le cheval atteint d'OA et d'étudier son activité dans la lésion et en périphérie de celle-ci.

Des échantillons de cartilage articulaire équin de 12 chevaux (5 sains et 7 atteints d'OA) ont été prélevés post-mortem. Des examens macroscopique, histologique et immunohistochimique ont été réalisés. Les échantillons ont été classifiés selon leur apparence macroscopique: sains, péri-lésion et lésion, ensuite la dégradation cartilagineuse des échantillons a été gradée de façon semi-quantitative, histologiquement et immunohistologiquement. La CK et les produits de dégradation de l'enzyme ont été détectés avec des anticorps et une comparaison du néoépitope de la CK (C2K) avec le néoépitope produit par les collagénases (C2C) a été faite par immunohistochimie sur les mêmes sections cartilagineuses.

La CK et le C2K étaient présents en quantité plus importante dans le cartilage atteint d'OA, dans la lésion et en périphérie de celle-ci. Les changements macroscopiques et histologiques étaient également statistiquement corrélés avec les résultats immunohistochimiques et finalement, le patron de dégradation immunohistochimique pour C2K était semblable à celui pour C2C, soulignant l'importance de la dégradation de la CK dans le cartilage atteint d'OA.

Ces résultats indiquent que la CK pourrait être considérée une cible thérapeutique pour le développement d'un médicament pour la prévention ou le traitement de l'OA.

Mots clés: Cheval, cartilage, cathepsine K, ostéoartrrose, fibre de collagène de type II.

Abstract

The mechanisms leading to degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA) are complex and not yet fully understood. The roles of several enzymes that specifically cleave type II collagen, particularly collagenases (MMP-1 and MMP-13) have been studied extensively. Cathepsin K (CK) is a cysteine protease which can also cleave the triple helical type II collagen molecule. This specific cleavage exposes an epitope that can now be identified by specific antibodies. The aim of this study was to investigate the role of CK in naturally occurring equine OA and to study its activity in both lesional and peri-lesional regions.

Articular cartilage (n=12 horses; 5 normal, 7 OA) was harvested from animals post-mortem. A gross macroscopic examination, histologic (Safranin-O Fast Green and Picrosirius Red staining) and immunohistochemical evaluation was performed. Samples were divided into normal appearing cartilage, peri-lesional and lesional cartilage, following the macroscopic examination. Cartilage degradation in the samples was graded histologically and immunohistochemically. CK and CK cleavage was detected with specific antibodies. A comparison of CK neoepitope (C2K) production with the neoepitope produced by collagenases (C2C) was also assessed immunohistochemically on contiguous sections.

CK and CK cleavage was significantly more abundant in OA cartilage (both peri-lesional and lesional) on immunohistochemical assessment. The immunohistochemical pattern observed for CK degradation (C2K) was similar to that of collagenase degradation (C2C). Macroscopic cartilage changes and histologic findings were significantly correlated with immunohistochemistry results.

The data suggests that CK may be involved in cartilage degradation in naturally occurring osteoarthritis (OA). CK could be considered a pharmaceutical target for the prevention of cartilage degradation in OA.

Key words: Horse, Cartilage, Cathepsin K, Osteoarthritis, Type II collagen

Table des Matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Recension de la littérature et méthodologies.....	3
1.1. L'articulation synoviale.....	3
1.1.1. Le cartilage articulaire.....	3
1.1.1.1. La matrice extracellulaire.....	5
• Le collagène.....	5
• Les protéoglycanes.....	6
• La phase liquide et les autres molécules.....	6
1.1.1.2. Les chondrocytes.....	7
1.1.2. La membrane synoviale.....	7
1.1.3. Le liquide synovial.....	8
1.1.4. L'os sous-chondral.....	8
1.2. Le métabolisme cartilagineux.....	8
1.2.1. Les stimuli biomécaniques.....	8
1.2.2. Enzymes matricielles.....	9
1.2.3. Les cytokines.....	9
1.2.4. L'oxyde nitrique.....	10
1.2.5. Les prostaglandines.....	11
1.3. L'ostéoarthrose chez le cheval.....	11
1.3.1. Introduction.....	11

1.3.2. Etiopathogénie de l'ostéoartrrose.....	12.
1.4. Pathophysiologie de l'ostéoartrrose.....	14
1.4.1. Altérations synoviales.....	15
1.4.2. Altérations osseuses.....	15
1.4.2.1. Transformation de l'os sous-chondral.....	15
1.4.2.2. Les ostéophytes.....	17
1.4.3. Altérations cartilagineuses.....	18
1.4.3.1. Dégradation enzymatique matricielle.....	25
1.4.3.1.1. Les métallo-protéases.....	25
• Les métallo-protéases matricielles.....	25
• Les adamalysines.....	27
1.4.3.1.2. Les cystéines protéases.....	28
• Cathepsine B.....	29
• Cathepsine K.....	29
Chapitre 2 : Problématique et but de l'étude.....	34
2.1. Problématique.....	34
2.2. Hypothèse.....	34
2.3. Objectifs.....	34
Chapitre 3 : Article.....	35
3.1. Summary.....	37
3.2. Introduction.....	38
3.3. Methods.....	40
3.3.1. Cartilage specimens.....	40
3.3.2. Specimen collection.....	40
3.3.3. Preparation of sections.....	41
3.3.4. Histologic grading.....	41
3.3.5. Immunohistochemistry.....	41
3.3.5.1. Antisera: C2K generated cleavage neopeptide in type II collagen.....	41

3.3.5.2. CK antiserum.....	42
3.3.5.3. C2C mouse monoclonal antibody to collagenase generated cleavage neoepitope in type II collagen.....	42
3.3.6. Immunolocalization.....	42
3.3.7. Immunohistomorphometric analysis.....	43
3.3.8. Statistical analysis.....	43
3.4. Results.....	44
3.4.1. Macroscopic findings.....	44
3.4.2. Histologic examination.....	44
3.4.2.1. Safranin O-Fast Green.....	44
3.4.2.2. Picrosirius red.....	44
3.4.3. Immunolocalization.....	45
3.4.3.1. C2K: Cleavage of type II collagen by CK.....	45
3.4.3.2. CK.....	46
3.4.3.3. C2C: Cleavage of type II collagen by collagenases...	46
3.4.4. Correlations.....	47
3.5. Discussion.....	48
3.6. Acknowledgements.....	52
3.7. References.....	53
3.8. Figure and table legends.....	57
Chapitre 4 : Discussion.....	69
Conclusion.....	73
Bibliographie.....	74

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I : Classification générale des cytokines et action sur le métabolisme cartilagineux – selon Caron 2003.	10
---	----

Chapitre 2

Table 5: Spearman rank correlations between immunohistochemical grades, macroscopic joint grades and histologic grades. Macro: Macroscopic grade. SOFG: Modified Mankin grade. C2K: immunohistochemical grade for type II collagen cleavage by Cathepsin K. C2C: immunohistochemical grade for type II collagen cleavage by collagenases (MMP). Cathepsin K: immunohistochemical grade for cathepsin K localization.	68
---	----

Liste des figures

Chapitre 1

- Figure 1 :** Représentation schématique d'une articulation synoviale et des tissus qui la composent. 3
- Figure 2 :** Représentation du cartilage articulaire normal avec la morphologie et l'orientation des chondrocytes et des fibrilles de collagène – selon Frisbie 2006. 4
- Figure 3 :** Représentation du réseau de fibrilles de collagène et des agréganes dans le cartilage articulaire – selon Poole 2001. 6
- Figure 4 :** Représentation d'une articulation synoviale normale avec les changements d'OA – selon Frisbie 2006 15
- Figure 5 :** Radiographie à haute résolution d'un tarse de cheval présentant un ostéophyte. A droite, la lésion macroscopique et à gauche, la représentation histologique mise en évidence avec la coloration Bleu de toluidine – selon Laverty et al 1991. 18
- Figure 6 :** Photographie du cartilage articulaire de la première phalange d'un cheval présentant des lésions d'ostéoarthrose (érosion). 20
- Figure 7 :** Photographie d'une coupe histologique de cartilage articulaire équin atteint d'OA. Le cercle délimite un amas de clones (ou "clusters") de chondrocytes à proximité des fissures. 21

- Figure 8 :** Photographie du cartilage articulaire du carpe de cheval présentant des lésions d'ostéoarthrose. A gauche, les lésions macroscopiques et à droite, les lésions histologiques mises en évidence avec la coloration Safranine-O Fast Green. 22
- Figure 9 :** Schéma d'un agrégat de protéoglycanes et des domaines G₁, G₂, G₃ (Rühimäki and Vükari Juntura 2000) 29
- Figure 10 :** Structure biochimique de la pro-cathepsine K (Frederick 2000) 30
- Figure 11 :** Section de cartilage canin avec la représentation immunohistochimique de la cathepsine K (Pelletier *et al.* 2005). 31
- Figure 12 :** Voie intracellulaire et extracellulaire de dégradation des cathepsines et MMPs et leur régulation par les glycosaminoglycanes – selon Li et al 2000. 32
- Figure 13 :** Test immunohistochimique négatif sur du cartilage articulaire de souris saine (image de gauche) et test immunohistochimique positif sur du cartilage articulaire de souris génétiquement modifié (UTU17) (image de droite) – selon Morko et al 2005. 33

Chapitre 2

Figure 1

Representative OA lesion on the distal metacarpus illustrating 3 sites from which cartilage was harvested postmortem: L = lesion, PL = adjacent to the lesion, and R = remote from the lesion. 59

Figure 2

Representative cartilage histologic sections from 3 sites in OA joints: remote (R), peri-lesion (PL) and lesion (L). A, Safranin O-Fast Green (SOFG) (stains proteoglycan) stained sections showed a reduction of the staining, hypocellularity and loss of cartilage thickness with the progression of OA. B, Picrosirius red staining (stains collagen) illustrating non-aligned fibers and heterogeneous staining with the progression of the disease from the surface to the deeper zones of cartilage (original magnification x 50, bar = 100 μ m).

60

Figure 3

Vertical scatter plot illustrating comparisons between the histological and immunohistochemical assessments of cartilage sections from healthy (H) and OA joints: remote cartilage (R), peri-lesion (PL) and in the lesion (L). * $P < 0.05$ vs. N; § $P < 0.05$ vs. R; ¶ $P < 0.05$ vs. PL.

61

Figure 4

Immunohistochemically stained representative sections of articular cartilage from 3 sites within OA joints (remote (R), peri-lesion (PL) and lesion (L)). For C2K immunolocalization (CK collagen cleavage) and C2C immunolocalization (MMPs collagen cleavage) we observed an increase in stain in OA sections and the depth of the staining increased with the severity of OA. CK immunolocalization was situated in chondrocyte lacunae and surrounding matrix. Brown colour represents positive staining (original magnification x 50, bar = 100 μ m).

62

Figure 5

Representative patterns of staining with CK at higher magnification. There is an absence of staining in cartilage sections from healthy

63

joints (H) and from remote sites in OA (R): a progressive increase of CK staining was observed in chondrocyte lacunae and surrounding matrix with increasing severity of the disease. PL illustrates a peri-lesion and L a lesion sample (original magnification x 50, bar = 100 μ m).

Liste de sigles et des abréviations

ADAMS	A Disintegrin And Metalloprotease
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs
ADAMTS-4	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs-4
ADAMTS-5	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs-5
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor (Facteur de croissance fibroblastique basique)
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CDI	Cartilage Degeneration Index (Index cartilagineux de dégénération)
CK	Cathepsin K (Cathepsine K)
CS4	Chondroitin Sulfate 4 (Sulphate de chondroïtine 4)
DHEA	DeHydroEpiAndrosterone
DNA	DesoxyriboNucleic Acid
FGF	Fibroblast Growth Factor (Facteur de croissance fibroblastique)
GAG	GlycosAminoGlycans (Glycosaminoglycanes)

IGF-1	Insuline-like Growth Factor-1 (Facteur de croissance insulinomimétique-1)
IL	InterLeukine
IL-1	InterLeukine-1
IL-1 α	InterLeukine-1α
IL-1 β	InterLeukine-1β
IL-4	InterLeukine-4
IL-6	InterLeukine-6
IL-10	InterLeukine-10
IL-13	InterLeukine-13
IL-1ra	InterLeukine-1 receptor antagonist (Récepteur antagoniste de l'interleukine-1)
iNOS	Inducible Nitric Oxyde Synthase
MMP	Matrix MetalloProtease (Métallo-protéase matricielle)
MMP-1	Matrix MetalloProtease-1 (Métallo-protéase matricielle-1)
MMP-2	Matrix MetalloProtease-2 (Métallo-protéase matricielle-2)
MMP-3	Matrix MetalloProtease-3 (Métallo-protéase matricielle-3)
MMP-7	Matrix MetalloProtease-7 (Métallo-protéase matricielle-7)
MMP-8	Matrix MetalloProtease-8 (Métallo-protéase matricielle-8)

MMP-9	Matrix MetalloProtease-9 (Métallo-protéase matricielle-9)
MMP-10	Matrix MetalloProtease-10 (Métallo-protéase matricielle-10)
MMP-13	Matrix MetalloProtease-13 (Métallo-protéase matricielle-13)
mRNA	messenger RiboNucleic Acid (Acide ribonucléique messenger)
NO	Nitric Oxyde (Oxyde nitrique)
NOS	Nitric Oxyde Synthase (Oxyde nitrique synthase)
OA	OstéoArthrose
PGE ₂	ProstaGlandine E₂
TGF- β	Transforming Growth Factor-β (Facteur de croissance transformant- β)
uPA	urokinase Plasminogen-Activator (Activateur plasminogène de l'urokinase)
TGF- β 3	Transforming Growth Factor-β 3 (Facteur de croissance transformant- β)
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProtenase (Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-α (Facteur onco-nécrosant- α)

Remerciements

A Dr Sheila Laverty, *directrice*

Muchas gracias por todo este tiempo pasado a su lado. Je ne lirai plus un article de la même façon, esprit critique mais avec diplomatie. Ce n'est pas juste une façon de travailler que vous m'avez enseigné, mais une attitude à avoir dans la vie de tous les jours. Croire en soi, travailler, mais se remettre toujours en question et regarder autour de nous, sans ne jamais blesser personne avec notre attitude ou notre façon d'agir...un peu difficile au début pour une espagnole impulsive!!

A Dr A. Robin Poole, *codirecteur*

Thank you very much for your advice and for sharing your knowledge in the field of cartilage and immunology.

A Dr Christine Théorêt, *présidente-rapporteuse*

Pour avoir accepté de présider le jury d'évaluation.

A Dr Bruce D. Murphy, *membre du jury*

Pour avoir accepté de participer au jury d'évaluation.

Au réseau canadien de l'arthrite

Pour la bourse qui m'a été octroyée et qui m'a permis de réaliser cette maîtrise.

A Mme Hélène Richard, Dr Valeria Dejica et Dr John Mort

Merci beaucoup pour cette introduction dans le monde de la recherche, des épitopes et des préparations de solutions.

A Florent, pour son soutien dans les moments difficiles, son amour et pour croire en moi toute au long de ces années.

A mes parents pour le soutien moral et affectif tout au long de ma vie.

Introduction

L'ostéoarthrose est une affection très répandue dans l'industrie équine qui engendre des pertes économiques importantes, particulièrement chez les chevaux de course. La qualité de la performance athlétique et la durée de vie en compétition sont significativement réduites par la douleur, la raideur et la limitation de l'amplitude des mouvements.

En dépit des recherches intensives entreprises depuis des années, l'étiologie exacte de l'ostéoarthrose reste encore méconnue. Chez le cheval athlète, les facteurs mécaniques et plus spécifiquement les traumatismes répétitifs sont considérés comme une cause initiale importante de dommage articulaire. Le cartilage endommagé présente un faible potentiel de guérison ; il va produire du tissu de nature fibreuse qui ne possède pas les caractéristiques du cartilage hyalin original. Ce processus de guérison inadéquat se traduit par une relâche de molécules pro-inflammatoires par les différentes cellules articulaires, en particulier par les chondrocytes, ayant comme conséquence l'activation de plusieurs cascades enzymatiques qui vont produire une augmentation de la synthèse des protéases, responsables de la dégradation enzymatique de la matrice cartilagineuse.

En conséquence, des mécanismes physiologiques de guérison se mettent en place, mais se trouvent rapidement dépassés par les phénomènes cataboliques. Ainsi le phénomène se poursuit jusqu'à l'apparition d'ostéoarthrose, menant éventuellement à la perte de fonction de l'articulation.

En ce qui concerne les voies de dégradation enzymatiques, la voie des métalloprotéases de la matrice a été étudiée exhaustivement ces dernières années. Les membres de cette famille d'enzymes ont la capacité de digérer la plupart des composants majeurs et mineurs de la matrice cartilagineuse. Elles se trouvent en quantité accrue dans le cartilage arthrosique, sont actives à un pH physiologique et sont également produites par les chondrocytes et les synoviocytes. Malgré toutes ces caractéristiques, aucun résultat concluant ne ressort des inhibitions réalisées sur les métalloprotéases de la matrice.

C'est pourquoi, divers chercheurs tentent de se réorienter vers une nouvelle voie de dégradation enzymatique : la voie de la cathepsine K. Cette enzyme présente des mécanismes d'actions à un pH qui est différent de celui des métalloprotéases de la matrice. Elle présente également d'autres caractéristiques collagéniques, qui la différencient des classiques MMP.

Le rôle de la cathepsine K chez les chevaux atteints d'ostéoarthrose, n'a jamais été démontré, donc le but de notre étude est d'étudier en profondeur la manifestation de cette enzyme dans le cartilage équin.

Chapitre 1 : Recension de la littérature et méthodologies

1.1. L'articulation synoviale

L'articulation peut être considérée comme un organe qui joue un rôle primaire dans la stabilité et la mobilité du squelette (Dewire and Einhorn 2001).

L'articulation synoviale permet un mouvement ample entre des os adjacents, qui se trouvent recouverts d'une couche lisse de cartilage hyalin. Une capsule articulaire doublée intérieurement par une membrane synoviale, limite les mouvements, en association avec les ligaments, qui peuvent être extra ou intra-articulaires. Les surfaces articulaires sont lubrifiées par un film de liquide synovial. (Eurell and Van Sickle 1998) (Figure 1)

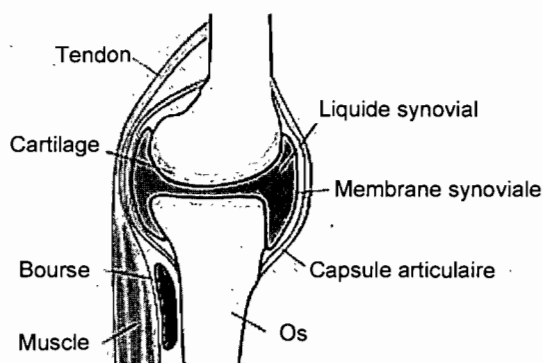


Figure 1 : Représentation schématique d'une articulation synoviale et des tissus qui la composent.

1.1.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage hyalin est l'unique tissu qui forme la surface articulaire de l'articulation synoviale (Dewire and Einhorn 2001). Il est composé d'eau (75%), de collagène type II (15%), de protéoglycanes (10%) et de chondrocytes (2%) (Goodrich and Nixon 2006). Il permet le support et le glissement des surfaces articulaires les unes contre les autres. Ce tissu est dépourvu de structures nerveuses, vasculaires et lymphatiques (Radin 2001). Avec le vieillissement, la synthèse de protéoglycanes diminue, le contenu en collagène augmente et le tissu cartilagineux devient plus fin, plus raide et moins déformable (Kurz *et al.* 2005).

Chapitre 1 : Recension de la littérature et méthodologies

1.1. L'articulation synoviale

L'articulation peut être considérée comme un organe qui joue un rôle primaire dans la stabilité et la mobilité du squelette (Dewire and Einhorn 2001).

L'articulation synoviale permet un mouvement ample entre des os adjacents, qui se trouvent recouverts d'une couche lisse de cartilage hyalin. Une capsule articulaire doublée intérieurement par une membrane synoviale, limite les mouvements, en association avec les ligaments, qui peuvent être extra ou intra-articulaires. Les surfaces articulaires sont lubrifiées par un film de liquide synovial. (Eurell and Van Sickle 1998) (Figure 1)

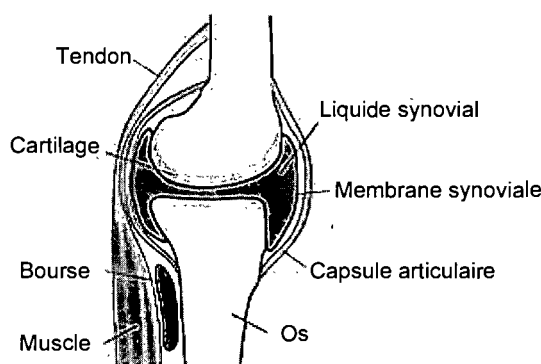


Figure 1 : Représentation schématique d'une articulation synoviale et des tissus qui la composent.

1.1.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage hyalin est l'unique tissu qui forme la surface articulaire de l'articulation synoviale (Dewire and Einhorn 2001). Il est composé d'eau (75%), de collagène type II (15%), de protéoglycanes (10%) et de chondrocytes (2%) (Goodrich and Nixon 2006). Il permet le support et le glissement des surfaces articulaires les unes contre les autres. Ce tissu est dépourvu de structures nerveuses, vasculaires et lymphatiques (Radin 2001). Avec le vieillissement, la synthèse de protéoglycanes diminue, le contenu en collagène augmente et le tissu cartilagineux devient plus fin, plus raide et moins déformable (Kurz *et al.* 2005).

Le cartilage articulaire est composé de 4 couches : une **couche superficielle** qui contient la plus grande densité en chondrocytes et un faible taux de protéoglycanes. Les fibres de collagène sont orientées parallèlement à la surface articulaire, tout comme les chondrocytes. Ceux-ci sont isolés, de petite taille et de forme allongée. La **couche intermédiaire** contient les chondrocytes distribués anarchiquement par groupe de 2 ou 3. Ils sont arrondis et de taille supérieure à ceux rencontrés dans la couche superficielle. La **couche profonde** contient des chondrocytes sphériques, de taille supérieure à la couche de transition, agencés en colonnes. Cette couche présente un taux élevé de protéoglycanes et de fibres de collagène de gros diamètre, disposées de façon perpendiculaire à la surface osseuse. La **couche calcifiée** présente un contenu en protéoglycanes diminué et des chondrocytes hypertrophiés, leur noyau devient petit et ils perdent leur disposition en colonne. Les fibres de collagène pénètrent dans l'os épiphysaire, permettant ainsi l'ancrage du cartilage articulaire. Cette couche est séparée des zones plus superficielles par une ligne irrégulière de calcification tangentielle à la surface, appelée « tidemark ou ligne de marée haute ». (Dewire and Einhorn 2001; Frisbie 2006; Ge *et al.* 2006; Genevois 1992; Poole *et al.* 2001) (Figure 2)

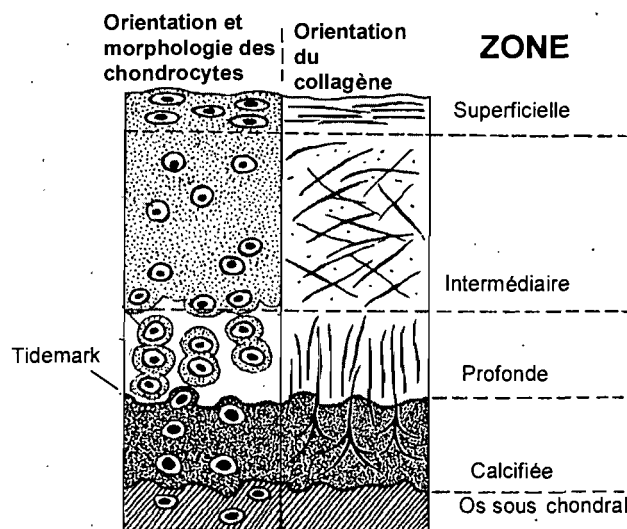


Figure 2 : Représentation du cartilage articulaire normal avec la morphologie et l'orientation des chondrocytes et des fibrilles de collagène – selon Frisbie 2006.

1.1.1.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est la partie la plus importante en volume du cartilage articulaire (Mankin and Brandt 1992). Elle est composée par une trame de fibres de collagène (support structural) qui baignent dans une substance fondamentale constituée de protéoglycanes et d'eau. Les interactions entre ses deux phases sont responsables des propriétés mécaniques du cartilage. Cette matrice donne au cartilage ses propriétés de compression et de transmission de force à l'os sous-chondral tout en offrant une surface lisse propice aux mouvements articulaires (Mow and Ratcliffe 1997). Les constituants de la matrice extracellulaire sont soumis à un renouvellement lent mais constant. Pour les protéoglycanes le renouvellement est d'environ 280 jours et pour le collagène, il est estimé à 400 ans selon certaines études (Werb and Alexander 1994).

- **Le collagène**

Le collagène est le premier composant protéique du cartilage articulaire (Dewire and Einhorn 2001). Il en existe différents types dans le cartilage articulaire : II, VI, IX, X, XI, XII et XV (Poole 2001). Le collagène de type II est le plus abondant au niveau du cartilage hyalin (Dewire and Einhorn 2001; Poole 2001; Radin 2001). Il est constitué de 3 chaînes glycoprotéiques identiques de type $\alpha_1(I)$. Leur structure primaire (Gly-X-Y) est répétée de nombreuses fois. Dans 13% des cas X est une proline, et dans 9% des cas Y est une hydroxyproline. Ces chaînes s'assemblent par trois pour former une triple hélice, compacte, régulière et hydrophobe, appelée procollagène. La solubilité du procollagène est assurée par les extrémités N et C terminales, qui ne sont pas agencées en triple hélice. A la sortie de la cellule ces extrémités sont coupées, et cette structure prend alors le nom de tropocollagène. Ces unités de procollagène s'assemblent pour former les fibrilles de collagène (Alberts *et al.* 2002).

Associés au collagène de type II, les collagènes de types IX et XI forment la partie centrale d'une organisation fibrillaire complexe. Le collagène de type XI se trouve à l'intérieur des fibrilles et le collagène de type IX réside à la surface des fibrilles dans une orientation antiparallèle au collagène de type II, apportant ainsi une stabilité inter-fibrillaire et des interactions avec les fibrilles non-collagéniques respectivement. Ce réseau de fibres est responsable de la force du cartilage et de sa capacité à conserver son volume et sa forme (Gouttenoire *et al.* 2004) (Figure 3).

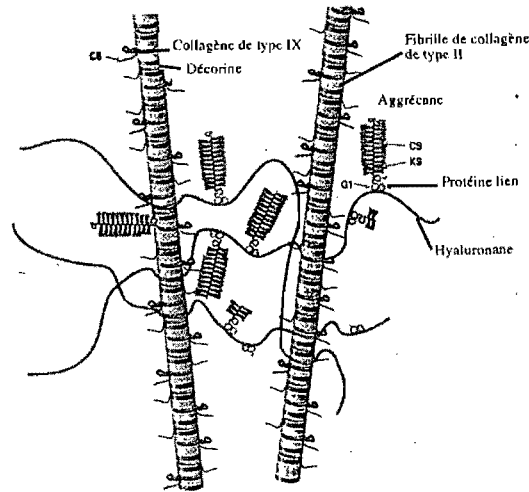


Figure 3 : Représentation du réseau de fibrilles de collagène et des agréganes dans le cartilage articulaire – selon Poole 2001.

- **Les protéoglycanes**

Les protéoglycanes constituent un composant solide de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire, ils remplissent le réseau tridimensionnel de fibrilles de collagène (Todhunter 1996). Les molécules d'acide hyaluronique et les fibres de collagène type II se lient à des sites spécifiques (Poole 2001). Les molécules de protéoglycanes sont composées de plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes liées de façon covalente à une protéine centrale se fixent sur la molécule d'acide hyaluronique pour former un agrégat, nommés les agréganes. Parmi ces glycosaminoglycanes, on retrouve les sulfates de chondroïtine (plus de 100 chaînes) et les sulfates de kératine (20 à 50 chaînes) (Dewire and Einhorn 2001). Toute cette trame donne ainsi au cartilage des propriétés biomécaniques particulières d'élasticité et d'amortissement des contraintes (Meyer and Wiesmann 2006).

- **La phase liquide et les autres molécules**

L'eau représente 75 à 80% du cartilage. La teneur en eau varie selon la localisation dans l'articulation. Elle aide au maintien de l'élasticité des tissus et contribue au système de lubrification (Mankin and Brandt 1992). La teneur en eau est maximale dans la couche superficielle et la majeure partie est extracellulaire. Des molécules comme la chondronectine, la fibronectine, les lipides et autres protéoglycanes de bas poids moléculaire participent aussi à

l'organisation, la stabilité et les connexions de différents composants de la matrice extracellulaire (Mankin and Brandt 1992).

1.1.1.2. Les chondrocytes

Le chondrocyte est le seul type cellulaire présent dans le cartilage articulaire (Meyer and Wiesmann 2006). Les chondrocytes représentent entre 0.4 et 2% du poids sec du cartilage. Ils dérivent de cellules mésenchymateuses, les chondroblastes, et se situent dans des lacunes au niveau de la matrice extracellulaire, seuls, en paires ou regroupés (Sledge 1994). De la zone superficielle à la zone profonde, les chondrocytes diminuent en nombre mais augmentent en taille (Ge *et al.* 2006).

Les chondrocytes sont un groupe hétérogène de cellules responsable de la production et du maintien de la matrice extracellulaire (Dewire and Einhorn 2001). Ils ont à la fois des capacités de synthèse (anabolisme) et de dégradation (catabolisme). En raison de la faible teneur en oxygène présente dans le cartilage, le métabolisme du chondrocyte est essentiellement anaérobie (Dewire and Einhorn 2001). En effet, la consommation en oxygène du chondrocyte articulaire correspond à 2% de celle des tissus vascularisés (Todhunter 1996). Les activités du chondrocyte sont régulées par plusieurs médiateurs inflammatoires et facteurs de croissance. Pour le maintien de l'homéostasie, il est alors essentiel que le catabolisme n'excède pas l'anabolisme, ce qui permet de maintenir intacte la structure cartilagineuse. Chez le jeune animal, le cartilage joue un rôle central dans la croissance et possède une activité métabolique intense. En revanche, chez l'adulte, le nombre de chondrocytes ainsi que leur activité mitotique et métabolique est diminué (Poole 2001).

1.1.2. La membrane synoviale

La membrane synoviale maintient l'homéostasie dans l'articulation. Elle est responsable de la synthèse du liquide synovial et c'est l'élément clef du système immunitaire de l'articulation. De l'extérieur vers l'intérieur la membrane synoviale comprend 2 couches : la couche sous-intimale, composée de fibroblastes, cellules endothéliales, mastocytes et macrophages, qui est dotée d'une vascularisation importante et une couche intimale composée de 2 ou 3 strates de cellules synoviales ou synoviocytes, sa surface interne étant recouverte de villosités microscopiques (Genevois 1992). Il existe 3 types de synoviocytes : le type A, responsable de la

phagocytose, le type B, un dérivé du fibroblaste, qui a une fonction synthétique et le type C précurseur des types A et B (Dewire and Einhorn 2001).

1.1.3. Le liquide synovial

Le liquide synovial est un liquide visqueux et clair, produit dans la membrane synoviale. Il est formé à partir d'un ultrafiltrat de plasma sécrété par les synoviocytes de type B et contient de l'acide hyaluronique et des glycoprotéines (Dewire and Einhorn 2001). Il joue un rôle important dans la nutrition du cartilage articulaire et sert de lubrifiant. On y trouve également plusieurs cellules en suspension : monocytes, macrophages et lymphocytes (Cormack 1993).

1.1.4. L'os sous-chondral

La plaque sous chondrale est constituée par du tissu osseux cortical (Frisbie 2006). Elle représente une zone de transition entre le tissu cartilagineux et l'os trabéculaire de l'épiphyse et joue ainsi un rôle primordial dans l'amortissement des chocs (Loeuille 2004). Les systèmes haversiens dans la plaque sous chondrale sont disposés parallèlement à la surface articulaire, contrairement à ceux présents dans l'os diaphysaire qui sont organisés de façon perpendiculaire (Frisbie 2006). Cette organisation permet, au même titre que le cartilage calcifié, de transformer les forces de cisaillement en forces de compression (Loeuille 2004).

1.2. Le métabolisme cartilagineux

Le chondrocyte synthétise, organise et régule la composition de la matrice extracellulaire. A chaque étape du développement, de la croissance et de la maturation, les taux relatifs de dégradation et de synthèse de la matrice sont ajustés. Le résultat net obtenu détermine un état de croissance, d'équilibre ou de dégradation (Todhunter 1996). Les chondrocytes, les cellules inflammatoires et les synoviocytes sous l'influence et le contrôle de divers facteurs comme **les stimuli biomécaniques, les enzymes matricielles, les cytokines, l'oxyde nitrique (NO) et les prostaglandines** vont réguler l'homéostasie du cartilage.

1.2.1. Les stimuli biomécaniques

Les stimuli biomécaniques permettent la nutrition du cartilage selon deux voies. La partie profonde (1/3 de l'épaisseur du cartilage) reçoit ses nutriments des vaisseaux épiphysaires sous chondraux grâce à des pores qui mettent directement en contact le cartilage calcifié et la moelle osseuse. La partie superficielle (2/3 de l'épaisseur du cartilage) reçoit ses nutriments du liquide synovial (Caron 2003). La compression ou mise en charge de l'articulation permet donc l'expulsion des déchets vers le liquide synovial alors que le relâchement ou mise au repos entraîne un retour de liquide nutritionnel dans le cartilage (Rodkey and McKinney 1993).

Depuis quelques années, des modèles d'étude *in vitro* permettent d'étudier l'impact de ces stimuli biomécaniques sur le métabolisme cartilagineux. Les forces qui s'appliquent *in vivo* sont une combinaison complexe de compression, cisaillement et tension (Palmer and Bertone 1996). L'application d'une compression mécanique statique (30-50% de compression par rapport à l'état non compressé) inhibe la synthèse des protéoglycanes et des protéines. En revanche, l'application d'une compression dynamique (1-4% de compression par rapport à l'état non compressé) stimule grandement la synthèse de matrice. En plus de la force de la compression, la fréquence de compression semble être un paramètre important. (Grodzinsky *et al.* 2000)

1.2.2. Enzymes matricielles

Les principales enzymes responsables du phénomène de remodelage et de dégradation de la matrice extracellulaire sont les protéases (ou endopeptidases ou enzymes protéolytiques). Ce sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines. Ce processus est appelé *clivage protéolytique*. Elles effectuent ce clivage ailleurs qu'aux extrémités des protéines, d'où

leur nom. Elles peuvent se trouver à l'intérieur de la cellule, dans les lysosomes, où elles participent à l'endocytose ou à distance de leur cellule d'origine (Werb and Alexander 1994). Il existe six types de protéases, mais les quatre types les plus importants au niveau du cartilage sont : les **métallo-protéases**, les **cystéine protéases**, les **serines protéases** et les **aspartate protéases** (Werb and Alexander 1994). Le rôle de ces enzymes et leur implication dans la dégradation cartilagineuse seront développés dans les prochaines sections.

1.2.3. Les cytokines

Les cytokines sont des petites protéines régulatrices produites par une variété de cellules dans le corps (Caron 2003). Dans les articulations, de nombreuses cytokines régulent le métabolisme cartilagineux sain et malade. Il existe trois catégories principales de cytokines selon leurs fonctions pro-inflammatoires ou cataboliques, régulatrices ou modulatrices et anaboliques. Cependant, certaines peuvent changer de catégorie, selon leur localisation tissulaire, leur concentration et le type de cellule stimulée par celles-ci (Martel-Pelletier et al. 1999) (Tableau I).

Catégorie	Cytokines	Actions
Cataboliques	IL- 1, TNF- α	Synthèse de métallo-protéases Production de NO et prostaglandines Inhibition de synthèse de collagène type II et aggrecanes
Modulatrices	IL- 4, IL- 6, IL- 10, IL- 13	Synthèse de TIMP Synthèse d'IL-1ra Inhibition de l'activité d'IL-1
Anaboliques	IGF-1, TGF- β , bFGF	Synthèse de collagène de type II Synthèse de protéoglycanes

Tableau I : Classification générale des cytokines et action sur le métabolisme cartilagineux – selon Caron 2003.

Les principales cytokines cataboliques impliquées dans la dégradation cartilagineuse sont l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur onconécrosant- α (TNF- α). Elles stimulent la production d'enzymes cataboliques et d'autres agents de dégradation (Loeser 2006). Les cytokines modulatrices telles l'interleukine-4 (IL-4), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-10 (IL-10) et l'interleukine-13 (IL-13), ont une fonction régulatrice sur les cytokines cataboliques et sur les

agents réactifs à l'oxygène (Loeser 2005). Les cytokines anaboliques sont produites spontanément en réponse à l'inflammation. Elles ont un rôle inhibiteur sur la production et l'activité des cytokines cataboliques *in vitro*, et seraient également chondro-protectrices *in vivo* (Goldring 2000).

1.2.4. L'oxyde nitrique

Le NO est un radical libre qui joue un rôle critique dans la régulation de la synthèse et la dégradation matricielle. Il est synthétisé dans les chondrocytes à partir de la L-Arginine sous l'action de la NO synthase (NOS) (Pelletier *et al.* 2001b). Il joue un rôle important dans les phénomènes de vasodilatation au sein de l'articulation, ce qui a pour conséquence d'augmenter la perméabilité vasculaire et l'afflux de leucocytes dans l'articulation. Également, le NO stimule la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 par les leucocytes et inhibe la synthèse du collagène et des protéoglycanes par les chondrocytes. Enfin, le NO induit l'apoptose du chondrocyte. Ce phénomène survient lors du développement ou du maintien de l'homéostasie (Jasin 2001).

1.2.5. Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des hormones de la famille des eicosanoïdes. Elles sont formées à partir de l'acide arachidonique par la cyclo-oxygénase (Furst and Hillson 2001). Plus spécifiquement la prostaglandine E₂ (PGE₂) est considérée comme un médiateur de l'inflammation responsable de l'hyperalgie articulaire par augmentation de la sensibilité des récepteurs à la douleur. Chez l'humain, la PGE₂ inhibe l'anabolisme chondrocytaire (Robinson 1997). Plus spécifiquement elle joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose des chondrocytes, la production des MMP et au niveau de l'os sous-chondral elle stimule la résorption osseuse et la formation d'ostéophytes par les ostéoblastes (Laufer 2003).

1.3. L'ostéoarthrose chez le cheval

1.3.1. Introduction

L'ostéoarthrose (OA) se définit comme une inflammation chronique d'intensité variable qui s'accompagne d'une altération destructrice initiale du cartilage articulaire avec des modifications secondaires de l'os épiphysaire (Pelletier *et al.* 2001a).

L'OA a été rapporté chez les dinosaures et les momies égyptiennes et c'est le désordre musculo-squelettique le plus commun des mammifères (Pelletier *et al.* 2001a). Chez l'humain, l'OA a un impact social, économique et psychologique très important. Cette maladie est associée au vieillissement et à la dégénérescence du cartilage, elle affecte 10 % de la population de plus de 60 ans. Actuellement aux États-Unis, il y a 20 millions de personnes atteintes d'OA; ceci suppose un budget pour l'état de 60 billions de dollars annuellement. Ces chiffres sont approximatifs, mais reflètent l'importance de la maladie et le vieillissement de la population (Riggs 2006). En 2020 la population estimée atteinte d'OA aux États-Unis devrait atteindre 60 millions d'individus, correspondant à un pays entier comme la France.

L'OA chez le cheval est aussi un problème significatif très répandu dans l'industrie équine qui engendre des pertes économiques significatives, particulièrement chez les chevaux de course. Cette maladie est à l'origine de réformes anticipées chez les chevaux de compétition (Jeffcott *et al.* 1982; Rossdale *et al.* 1985).

Chez le cheval, l'OA se manifeste par de la douleur articulaire, qui peut se caractériser au départ par une simple baisse des performances de l'animal ou une modification des allures. Au début de la condition, la douleur, l'effusion et de l'œdème limitent la mobilité articulaire (Caron 2003; McIlwraith 1996).

Chez le cheval athlète, l'OA se caractérise par des changements inflammatoires aigus accompagnés ou précédés de processus dégénératifs. Ceci s'explique par le travail intense et les contraintes mécaniques qu'ils exercent sur leurs articulations dès leur jeune âge. Les articulations mobiles comme l'articulation du carpe et l'articulation métacarpo-phalangienne sont les plus atteintes sous la forme d'une affection dégénérative articulaire. Les articulations de faible motilité, comme l'articulation intertarsienne et l'articulation interphalangienne débutent de la même façon mais souvent elles évoluent à terme en arthrose ankylosante. L'ostéoarthrose conduit à des altérations habituellement irréversibles et le traitement doit viser à la prévention de détériorations plus importantes de l'articulation (Adams 1990; McIlwraith 1996).

1.3.2. Etiopathogénie de l'ostéarthrose

L'étiologie exacte de l'OA est encore méconnue, mais il est maintenant reconnu que celle-ci est multiple et inclut des facteurs mécaniques, biochimiques et génétiques (Pelletier *et al.* 2001b). Contrairement aux humains chez qui on associe le plus souvent l'OA au phénomène de vieillissement, le cheval peut présenter cette pathologie, dès son jeune âge (McIlwraith 1996). Indépendamment de l'étiologie, il y a installation d'un phénomène inflammatoire au sein de l'articulation.

L'OA s'accompagne d'une destruction progressive du cartilage articulaire et rapidement de l'apparition d'ostéophytes, d'un remodelage de l'os sous-chondral, et de modifications des tissus péri-articulaires (muscles, ligaments, tendons,...). Son importance repose sur sa fréquence et sur sa gravité (Palmer and Bertone 1996). Cette condition est souvent rencontrée chez les chevaux de course où dès leur jeune âge, leurs articulations sont soumises à des contraintes mécaniques importantes (Jeffcott *et al.* 1982; Rosedale *et al.* 1985).

Dans l'étiologie de l'OA, on distingue classiquement deux origines:

Le phénomène mécanique, présent lorsque des contraintes mécaniques anormalement élevées s'exercent sur un cartilage initialement normal (déchirures ligamentaires, obésité, anomalie de conformation articulaire, défaut d'aplomb, traumatisme unique ou répétitifs, comme par exemple une chute pendant une réception d'un saut d'obstacle ou une course avec plusieurs sauts d'obstacles) (Caron 2003; McIlwraith 1996; Riggs 2006). Toute surcharge mécanique peut initier un cycle inflammatoire et catabolique, qui va entraîner une altération physique de la microstructure du cartilage, ainsi que des lésions cellulaires et membranaires. L'OA résulte donc d'un déséquilibre entre les forces qui s'exercent sur le cartilage et la résistance mécanique de ce dernier.

Le phénomène structural est présent lorsque des contraintes mécaniques normales s'exercent sur un cartilage dont les propriétés mécaniques sont altérées (arthrite septique, ostéochondrose, cause iatrogénique, d'origine auto-immune ou héréditaire) (Caron 2003; Riggs 2006). Les deux dernières conditions n'ont pas été démontrées jusqu'à présent chez les patients équins (Pool 1996). La stabilité de l'articulation, avec une transmission, dispersion, et absorption normales des forces, n'est donc pas possible car les constituants de l'articulation ne sont pas sains.

Concernant la pathogénie de l'OA, une controverse sur son origine persiste dans la littérature. La plupart des chercheurs pensent que les premières perturbations moléculaires débutent dans l'os sous-chondral. D'autres sont convaincus que c'est dans le cartilage qu'elles débutent.

La première hypothèse est basée sur la notion du cartilage initialement sain, mais soumis à des contraintes anormales qui vont entraîner des microfractures dans l'os sous-chondral, ou des fractures de la trame collagénique de la matrice extracellulaire (Caron 2003). Comme réponse aux traumatismes, l'os sous-chondral va scléroser. Cette sclérose sera à l'origine des lésions cartilagineuses secondaires qui vont principalement s'installer en zone de charge, c'est-à-dire sur les parties fonctionnellement très sollicitées (Kawcak *et al.* 2001). L'élément central de modification du cartilage articulaire est la désorganisation de la matrice extracellulaire (Riggs 2006). La libération de fragments de fibres de collagène de type II, de fibronectine et d'acide hyaluronique va stimuler le chondrocyte à entrer en phase catabolique (Pelletier *et al.* 2001b). Cette théorie reste à prouver, mais chez le cheval ce phénomène a été démontré au niveau du troisième os du carpe et au niveau du condyle palmaire du métacarpe chez les chevaux de course (Caron 2003; Muir *et al.* 2006).

La deuxième hypothèse considère les cellules du cartilage articulaire, les chondrocytes et les synoviocytes, comme des cellules mécano-sensibles susceptibles de s'activer lorsque les contraintes mécaniques dépassent un certain seuil. Ces dernières relâchent des cytokines qui à leur tour vont produire des enzymes protéolytiques responsables de la dégradation de la matrice (Caron 2003). Ce phénomène contribue à rompre l'équilibre entre les enzymes et leurs inhibiteurs, ce qui aboutit à une destruction progressive de la matrice du cartilage et à une mort des chondrocytes par apoptose ou nécrose (Riggs 2006).

1.4. Pathophysiologie de l'ostéarthrose

A l'intérieur de l'articulation l'OA est caractérisée par une dégénérescence cartilagineuse, une hypertrophie osseuse, un épaissement de la capsule articulaire et de la membrane synoviale (Riggs 2006) (Figure 4).

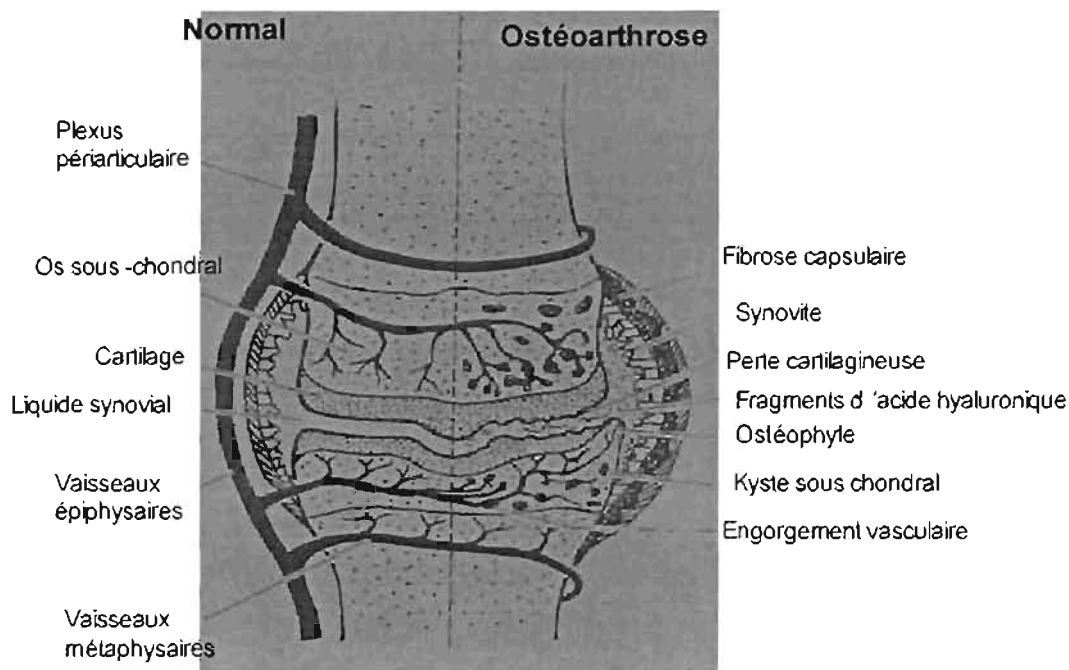


Figure 4 : Représentation d'une articulation synoviale normale avec les changements d'OA – selon Frisbie 2006

1.4.1. Altérations synoviales

Comme cité antérieurement la membrane synoviale va s'épaissir, produire une infiltration lymphoplasmocytaire du tissu sous-synovial, une augmentation de la vascularisation et du nombre de couches cellulaires et un accroissement du nombre et de la taille des villosités synoviales (Bolam *et al.* 2006). En conséquence le liquide synovial perd son aspect visqueux et cette modification de ses propriétés physicochimiques entraîne des troubles mécaniques (phénomène de friction préjudiciable au cartilage articulaire) par perte des capacités viscoélastiques du liquide, ainsi qu'une diminution de l'effet barrière de l'acide hyaluronique vis-à-vis des cellules et des molécules inflammatoires (Riggs 2006).

1.4.2. Altérations osseuses

1.4.2.1. Transformation de l'os sous-chondral

L'os sous-chondral à son tour réagit en se densifiant, c'est le phénomène de sclérose (Kawcak *et al.* 2001). L'ostéocondensation ou sclérose s'effectue par apposition de nouvelles travées osseuses à la face profonde de l'os sous-chondral et par renforcement des travées existantes. Elle débute par les zones correspondant au commencement des lésions cartilagineuses et elle est maximale lorsque l'os est à nu (Pelletier *et al.* 2004). Les traumatismes répétés que peuvent exercer les chevaux athlètes sur leurs articulations, amincissent le cartilage non calcifié, du fait de l'augmentation de la « tidemark » à partir de la réactivation des centres secondaires d'ossification (Kawcak *et al.* 2001). Malgré la présence massive d'os néoformé autour de l'articulation, l'espace articulaire reste identifiable.

Dans les phénomènes chroniques d'OA, les articulations montrent une certaine propension à l'ankylose suite à l'hyper-production osseuse (Caron 2003). Chez le cheval, ce phénomène d'arthrose ankylosante habituellement irréversible est retrouvé au niveau des articulations de faible motilité comme l'articulation interphalangienne proximale et l'articulation intertarsienne distale (McIlwraith 1996).

Histologiquement dans les phénomènes d'OA on observe au niveau de l'os sous chondral, une apposition ostéoblastique et une prolifération de la moelle, qui se métaplasie par endroits en îlots cartilagineux et osseux. Des microfractures et un tassement des travées osseuses épiphysaires, provoquant des microdommages diffus peuvent même apparaître sous l'effet des contraintes anormales, responsables des déformations épiphysaires rencontrées lors d'OA évoluée (Kawcak *et al.* 2001; Radin 1999). Plus tardivement, les excès de contrainte se répercutent sur l'os spongieux épiphysaire, entraînant une fragilisation des travées osseuses épiphysaires et une nécrose ostéocytaire. Ce phénomène est plus accentué aux endroits soumis à de fortes pressions.

Ceci a été démontré chez des chevaux pur sang de course qui subissent régulièrement des contraintes mécaniques intenses au niveau des parties distales des os métacarpien III ou métatarsien III. On retrouve donc au niveau de l'os sous chondral, un processus d'ossification endochondrale présent normalement lors de la période embryonnaire, qui est pathologiquement lié à l'hypervascularisation sous-chondrale (Muir *et al.* 2006).

Young et collaborateurs ont démontré chez les chevaux pur sang de course que le pourcentage de surface osseuse et les propriétés matérielles (rigidité) de l'os sous-chondral augmentent en densité comme réponse à l'exercice. Plus précisément, ils ont trouvé une corrélation positive de ces deux paramètres qui se localisent à 10 mm du bord dorsal de la facette radiale du troisième os du carpe (Young *et al.* 1991). Cependant, il a été observé que ce phénomène de sclérose osseuse peut être réversible et diminue avec la réduction de stress imposé sur l'articulation (Young *et al.* 1988).

Au niveau **moléculaire**, l'os sous chondral, qui est vascularisé, produit des médiateurs de l'inflammation et des cytokines dans le processus dégénératif de l'OA. Ces molécules atteignent le cartilage à travers l'infiltration de l'os sous-chondral, causant une dégradation de celui ci (Shibakawa *et al.* 2005). Entre autre, la présence d'IL-1 β , d'IL-6, de TGF- β et de PGE₂ a été observée au niveau de l'os sous-chondral. Cependant, il y avait une variabilité importante de résultats entre les différents paramètres de chaque molécule, il reste donc à déterminer la précision de leur expression qui expliquerait la rupture de l'homéostasie cartilagineuse (Massicotte *et al.* 2002).

Chez le chien, des modèles d'OA ont démontré une production importante au niveau de l'os sous-chondral et de l'os trabéculaire, d'ostéocalcine et de NO dans les stades précoces de la maladie (8 semaines) tandis que d'autres molécules, comme la phosphatase alcaline cellulaire, la PGE₂, les MMP et l'uPA apparaissaient plus tardivement (12 semaines) (Lavigne *et al.* 2005). Ceci peut expliquer les résultats obtenus par van der Harst et collaborateurs chez le cheval; cette équipe de chercheurs a mesuré les concentrations de nitrite et nitrotyrosine dans le cartilage articulaire, l'os sous-chondral et l'os trabéculaire équin. Ces deux produits ont été ciblés, comme les produits finaux de dégradation de l'oxyde nitrique. Les résultats de cette étude ont montré que la concentration de nitrotyrosine était supérieure au niveau de l'os sous-chondral, indiquant que le stress oxydatif est plus important dans l'os sous-chondral. Cette molécule serait donc un marqueur précoce d'OA pour l'os sous-chondral (van der Harst *et al.* 2006).

Un autre marqueur osseux étudié chez le cheval, est la sialoprotéine osseuse qui est une protéine transmembranaire de la famille des intégrines. Cette protéine sert de marqueur pour la formation précoce de l'os. Celle-ci a été utilisée, comme biomarqueur révélateur de modifications de l'os sous-chondral au niveau du troisième os du carpe (Ekman *et al.* 2005).

1.4.2.2. Les ostéophytes

L'OA avancée se caractérise par une irrégularité ou diminution de l'espace articulaire et par la présence d'ostéophytes. L'ostéophytose, processus de formation des ostéophytes, se déroule en périphérie de l'articulation, à la jonction du cartilage avec le périoste ou le long des insertions de la capsule synoviale sur l'os (McIlwraith 1996). Les ostéophytes sont des productions osseuses non spécifiques, que l'on retrouve dans de nombreuses affections inflammatoires ou dégénératives des articulations. La cause exacte de leur apparition est inconnue (Caron 2003); l'instabilité articulaire est considérée un facteur étiologique important comme prouvé par Simmons et collaborateurs, sur un modèle équin, où les ostéophytes se sont développés 8 semaines après l'induction d'une instabilité articulaire (Simmons *et al.* 1999). Les ostéophytes peuvent également se développer en l'absence d'instabilité, ceci étant le cas pour les ostéophytes que l'on retrouve sur la face dorsale des articulations inter-tarsiennes proximale et distale chez le cheval (Laverty *et al.* 1991) (Figure 5).

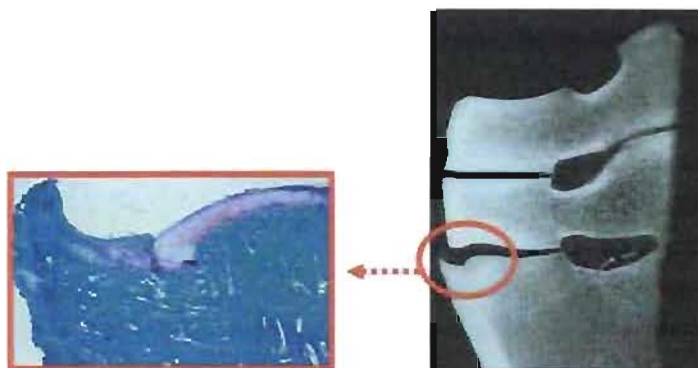


Figure 5 : Radiographie à haute résolution d'un tarse de cheval présentant un ostéophyte. A droite, la lésion macroscopique et à gauche, la représentation histologique mise en évidence avec la coloration Bleu de toluidine – selon Laverty et al 1991.

Ces formations réactionnelles élargissent et stabilisent le lit articulaire. Il existe quelques hypothèses chez l'humain qui se basent sur le fait qu'une douleur par distension du périoste et des structures péri-articulaires, peuvent gêner la mobilité entre les surfaces articulaires ou entre le cartilage et la membrane synoviale (Lozada and Altman 2001). Lorsqu'ils continuent à grossir progressivement, les ostéophytes peuvent entraîner divers degrés de déformations des articulations. (McIlwraith 1996).

Finalement, en ce qui concerne l'étude des ostéophytes sur des modèles expérimentaux d'ostéoartrrose, il a été démontré que le facteur de croissance transformant- β 3 (TGF- β 3) serait un des premiers médiateurs dans la formation d'ostéophytes (Blaney Davidson *et al.* 2007), mais ceci n'a pas encore été déterminé chez le cheval.

1.4.3. Altérations cartilagineuses

Le premier signe détectable de dégénérescence cartilagineuse dans le cas d'OA est le ramollissement de la surface articulaire du cartilage (Brama *et al.* 2001). La décoloration et l'irrégularité de la surface peuvent être aussi présentes (Clyne 1987). L'affaiblissement du cartilage se traduira par l'apparition de multiples fissures verticales, ce phénomène se dénommant **fibrillation**. Il a été rapporté que l'apparition de fibrillation cartilagineuse est associée à la perte de collagène (Martel-Pelletier *et al.* 2001).

Si la lésion s'accompagne d'une perte de surface cartilagineuse, on parle alors d'**érosion**, qui peut être associée à un amincissement du cartilage articulaire (Figure 6). Après cette perte de cartilage, l'os sous-chondral sera alors complètement exposé, on parle ainsi d'**ulcération**. L'**éburnation** est la dernière étape du phénomène dégénératif et elle se caractérise par l'augmentation de la densité, la teinte ivoire et la surface polie de l'os sous-chondral (Weisbrode and Doige 2001).

Dans le domaine de la recherche, les lésions d'OA peuvent être gradées selon leur degré d'atteinte cartilagineuse, le but étant de standardiser les lésions observées. Chez le cheval, il existe plusieurs systèmes de gradation macroscopiques entre autres: les scores numériques (Smith *et al.* 2006) et l'index cartilagineux de dégénération (CDI) : ce système calcule l'intensité de coloration à l'encre de chine (l'encre vient se figer où il y a une diminution dans le contenu des protéoglycanes) par la prise d'une photographie relié à un système de calcul (Brommer *et al.* 2003).

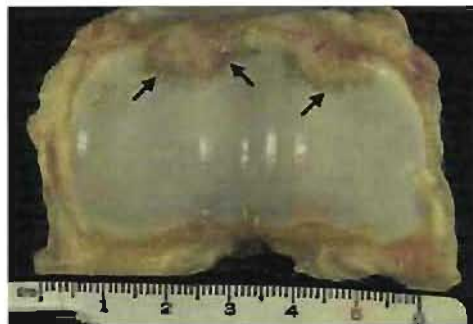


Figure 6 : Photographie du cartilage articulaire de la première phalange d'un cheval présentant des lésions d'ostéoarthrose (érosion).

L'élément central de modification du cartilage articulaire est la désorganisation du réseau des fibres de collagène. La perte de cohésion entre les fibres de collagène superficielles, liée à l'action d'enzymes cataboliques, entraîne une modification du contenu en eau du cartilage (par exposition des charges négatives des protéoglycanes qui attirent des cations comme le sodium et l'eau), d'où une dilution des protéoglycanes et une altération des propriétés biomécaniques du cartilage (Pelletier *et al.* 2001b). D'autre part, le relâchement de la trame fibrillaire provoque une diminution du rôle contentif du collagène vis-à-vis des protéoglycanes. Il en découle une fuite des protéoglycanes hors de la matrice cartilagineuse. Suite à la perte de protéoglycanes, les fibrilles de collagène deviennent incapables de résister aux forces qui leurs sont appliquées et se rompent (Buckwalter *et al.* 2000).

La **fibrillation** correspond donc à la rupture des fibres de collagène entraînant l'apparition de fissures cartilagineuses. L'orientation des fissures va suivre l'orientation des fibres de collagène : dans un premier temps, les lésions sont superficielles et tangentes à la surface, puis deviennent progressivement profondes et perpendiculaires à la plaque osseuse sous-chondrale (Kurz *et al.* 2005). La fibrillation aboutit ainsi à une perte progressive de tissu cartilagineux (Sandell and Hering 2001).

Au fur et à mesure de la progression de la fibrillation, la fissure s'étend sur toute l'épaisseur du cartilage articulaire, jusqu'à atteindre l'os sous-chondral, et l'exposer au liquide synovial, ce qui correspond aux deux derniers stades de dégradation cartilagineuse : l'**érosion** et l'**ulcération** (Hough 2001). Ainsi, lors de lésions cartilagineuses les chondrocytes réagissent en s'hypertrophiant et peuvent se multiplier, perdant progressivement leur disposition initiale en colonnes pour former des amas de clones (ou "clusters") à proximité des fissures (Buckwalter *et*

al. 2000) (Figure 7). Les chondrocytes vont donc proliférer mais ils ne vont pas réparer le cartilage. Lors de lésion profonde, la fissure se comble par du liquide synovial et éventuellement de tissu de granulation appelé fibrocartilage.



Figure 7 : Photographie d'une coupe histologique de cartilage articulaire équin atteint d'OA. Le cercle délimite un amas de clones (ou "clusters") de chondrocytes à proximité des fissures.

Au niveau **histologique** il existe plusieurs colorations qui peuvent être utilisées pour observer la composition et la structure des lésions décrites précédemment dans le cartilage articulaire lors d'OA (Eurell and Van Sickle 1998). Selon le composant cartilagineux que l'on veut étudier, il existe des colorants qui vont mettre en valeur un composant déterminé du cartilage. La Safranine O est le colorant le plus souvent utilisé pour l'évaluation des protéoglycanes et il est souvent associé au Fast green (Squires *et al.* 2003) (Figure 8). Le bleu de toluidine et le Bleu d'alcian peuvent également être utilisés comme colorants spécifiques pour les protéoglycanes (Hyllested *et al.* 2002). Pour les procédures histochimiques, il a été démontré que le Bleu de toluidine/Fast Green confère une qualité de teinture supérieure par rapport à la Safranine O/Fast green (Naumann *et al.* 2002).

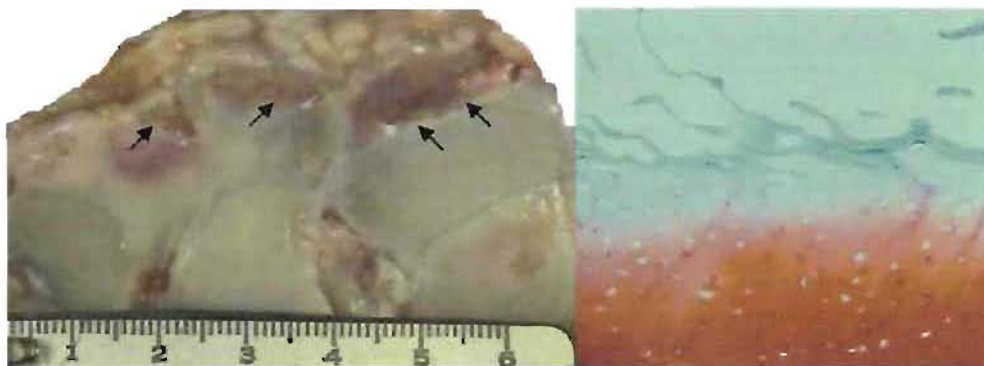


Figure 8 : Photographie du cartilage articulaire du carpe de cheval présentant des lésions d'ostéoarthrose. A gauche, les lésions macroscopiques et à droite, les lésions histologiques mises en évidence avec la coloration Safranine-O Fast Green.

Pour une évaluation optimale du collagène, plusieurs teintures sont utilisées : Picrosirius rouge, Trichrome de Masson et Trichrome de Mallory (Hyllested *et al.* 2002). L'observation de ces teintures nécessite d'une lumière polarisée.

Comme pour l'examen macroscopique, les coupes histologiques qui présentent de l'OA peuvent être gradées. Les systèmes de gradation les plus couramment utilisés se basent sur le score de Mankin (Mankin *et al.* 1971). Ce système d'évaluation permet de standardiser les lésions d'OA selon 4 paramètres : la structure du cartilage, les anomalies cellulaires, la coloration par la Safranine-O et l'intégrité de la « tidemark ». Selon l'addition des ces scores évoluant de 0 (cartilage sain) à 14 (cartilage très atteint), on peut donner un score numérique à une lésion (Mankin *et al.* 1971).

Au niveau de la recherche dans l'OA équine, les auteurs utilisent des scores de Mankin modifiés (Brama *et al.* 2001; Garcia-Seco *et al.* 2005; Smith *et al.* 2006) ou le score déterminé par la société de recherche internationale sur l'OA (OARSI) qui est le résultat d'un produit mathématique entre le grade et le stade d'OA (Bolam *et al.* 2006).

Si on s'intéresse aux altérations cartilagineuses moléculaires, les divers facteurs étiologiques précédemment décrits provoquent une rupture de l'équilibre dynamique de l'articulation et une augmentation des activités cataboliques (Loeser 2006). L'implication de l'inflammation dans ce phénomène catabolique est suspectée depuis une vingtaine d'années (Pelletier *et al.* 2001a), actuellement on pense que cette réaction inflammatoire serait responsable

de la sécrétion de protéases et de médiateurs pro-inflammatoires dans le liquide synovial (Loeser 2006; Pelletier *et al.* 2001a). Cependant les caractéristiques physiologiques du cartilage articulaire (absence de vascularisation et d'innervation) ne permettent pas une expression classique de l'inflammation (Pelletier *et al.* 2001a). Ceci explique que les symptômes cliniques n'apparaissent que tardivement, lorsque les structures voisines du cartilage sont atteintes.

Toutefois, il semble clair aujourd'hui que les chondrocytes jouent un rôle central dans l'altération moléculaire du cartilage lors d'OA. Leur capacité de synthétiser les différents composants de la matrice extracellulaire, les molécules pro-inflammatoires et les enzymes pouvant détruire ces mêmes composants matriciels font du chondrocyte, un des éléments clés de ce phénomène complexe (Sledge 1994).

Plus spécifiquement, les modifications moléculaires du cartilage se produisent en trois étapes qui se superposent : l'altération de la matrice extracellulaire, la réponse des chondrocytes à ces lésions tissulaires, puis la diminution de réponse chondrocytaire (Buckwalter *et al.* 2000). La rupture de l'homéostasie au niveau du cartilage articulaire sera le facteur déclenchant. Il en résulte une dégradation de la surface cartilagineuse et une relâche de produits de dégradation de la matrice cartilagineuse dans le liquide synovial. Les produits excrétés sont des débris de dégradation matricielle (fragments de fibres de collagène type II et fibronectine), des néoépitopes et des cristaux (Pelletier *et al.* 2001b).

Comme réponse à l'atteinte matricielle, la teneur en eau de la matrice extracellulaire va augmenter pour essayer de maintenir l'épaisseur de la structure (Caron 2003). Le chondrocyte va également répondre à cette hyperhydratation en augmentant son activité anabolique (par la production de cytokines pro-inflammatoire comme l'IL-1), son activité catabolique (par des molécules telles que les facteurs de croissance comme l'IGF-1, le TGF- β , le FGF et le BMP) et en se divisant (Goldring 2000; Pelletier *et al.* 2001a).

Les modifications du chondrocyte surviennent quand le phénomène catabolique prend le dessus sur l'activité anabolique, il en résulte donc une perte et destruction plus importante de la matrice cartilagineuse (Frisbie 2006; Loeser 2005; McIlwraith 1996). Finalement, le chondrocyte va s'hypertrophier et synthétiser des composants normalement absents ou présents en faible quantité, comme la fibronectine, les versicanes, les protéines non-collagéniques ou les fibres de collagène de type mineurs (Type III, IX et X) qui confèrent une protection et une longévité

amoindries. Il en résulte donc un changement dans le phénotype du chondrocyte (Sandell and Hering 2001) et une calcification de la matrice cartilagineuse (Poole *et al.* 2003).

A ce stade ci, le chondrocyte est très sensible aux cytokines, du fait de l'augmentation du niveau de récepteurs de cytokines dans la membrane cellulaire. Ceci va engendrer un ré-enclenchement du cycle de maturation cellulaire qui amène à une prolifération du chondrocyte puis à son hypertrophie et à sa mort par apoptose (Sandell and Hering 2001). L'apoptose des chondrocytes est donc la dernière étape du phénomène catabolique chondrocytaire dans l'OA (Huser *et al.* 2006). Les caspases (de l'anglais cysteinyl-aspartate-cleaving proteases) jouent un rôle primordial dans le phénomène d'apoptose des chondrocytes (Lalmanach *et al.* 2006). Elles sont présentes dans le cytoplasme sous forme inactive: les procaspases, qui vont ensuite être clivées et dimérisées pour former les caspases actives.

Chez le cheval, il a été démontré que les forces de compression excessives au niveau du cartilage activent les caspases. Ces enzymes à leur tour génèrent un stress mitochondrial et des agents cytotoxiques comme le NO qui est un des agents déclenchant de l'apoptose (Kim *et al.* 2003). Sur des modèles d'OA *in vitro* chez le cheval, les caspases 3, 8 et 9 ont été détectées et inhibées; ceci a apporté des résultats concluant sur l'inhibition de l'apoptose et leur rôle dans l'OA. Une dernière étude de cette équipe a pu mettre en cause le rôle actif du calcium comme molécule signal après un impact, sur le cartilage. Suite à l'impact, le réticulum endoplasmique relâcherait du calcium, qui activerait la dépolarisation mitochondriale et celle-ci à son tour activerait les différentes caspases (Huser and Davies 2007). L'inhibition des précurseurs de celles-ci, a donné des résultats très intéressants, mais des études plus approfondies restent encore à faire pour comprendre les mécanismes complexes de l'apoptose dans le cartilage (Huser *et al.* 2006).

A travers son processus catabolique, le chondrocyte essaye de remplacer ou réparer les molécules endommagées. Cependant, il existe d'autres molécules qui vont favoriser le phénomène catabolique et accentuer la dégradation articulaire; on retrouve le **NO**, la **PGE₂**, les **radicaux libres** et la **substance P**.

Le NO apparaît dans le liquide synovial suite à l'activation d'une NOSynthase inductible (iNOS), ce dernier empêche toute action des inhibiteurs des interleukines. Le processus va donc s'auto-entretenir. Egalement, chez le cheval, dans des cultures d'explant de cartilage articulaire, il a été observé que le NO était capable d'inhiber la synthèse d'aggrécane, ce qui démontre le rôle

anti-anabolique de cette molécule (Bird *et al.* 2000). Une étude intéressante réalisée sur le sérum de chevaux sains et des chevaux atteints OA juvénile, vient donner de l'importance à la présence du NO dans ce phénomène dégénératif. Ils ont démontré par un immunoessai spécifique chez les chevaux atteints d'OA, qu'un peptide dérivé de la triple hélice de collagène de type II associé au NO était significativement plus présent que le peptide seul. Des études approfondies restent à réaliser pour détecter où se produit cette nitration, dans le liquide synovial, la membrane synoviale, le cartilage articulaire ou le sang (Lejeune *et al.* 2007). Néanmoins ces résultats ouvrent une voie pour l'association de ce phénomène de nitration au phénomène de dégradation articulaire.

De son côté la PGE₂ joue un rôle majeur dans l'apparition de la synovite. Elle provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire, une vasodilatation et possède des effets chimiotactiques (Robinson 1997). Les radicaux libres sont synthétisés par les macrophages et les neutrophiles lors de la phagocytose (McIlwraith 1996). Chez le cheval, après l'induction d'une synovite, on a retrouvé des radicaux libres dans le liquide synovial de l'articulation mais aussi dans celui de l'articulation controlatérale ainsi que dans le plasma sanguin (Auer *et al.* 1993). Il a été constaté *in vitro* que ces radicaux libres induisent une diminution de la viscosité synoviale par dépolymérisation des acides hyaluroniques. Ils agissent ainsi en diminuant la fonctionnalité du liquide synovial favorisant ainsi l'apparition de lésions chondrales secondaires. Quant à elle, la substance P est un neurotransmetteur qui induirait la synthèse de prostaglandines et de collagénases par les synoviocytes. Elle induirait également la synthèse d'IL-1 et de TNF- α par les monocytes qui stimuleraient eux-mêmes la libération de substance P (Pelletier *et al.* 2001b).

A la suite de la dégradation cartilagineuse et comme réponse à la relâche de produits excrétés par le chondrocyte, la membrane synoviale active les synoviocytes A, la phagocytose par les macrophages et induit une inflammation chronique, qui se traduit par une synthèse de protéases et de cytokines dont l'IL-1 et le TNF- α (Caron 2003). IL-1 est la cytokine par excellence que l'on rencontre lors d'OA. Il existe 2 formes : l'IL-1 α et β . Chez le cheval, des cultures de cartilage *in vitro* ont démontré que l'IL-1 β était plus active que l'IL-1 α , et que son rôle était primordial dans la dégradation cartilagineuse lors d'OA (Gregg *et al.* 2006).

Les cytokines diffusent donc à travers le liquide synovial, pour se rendre finalement dans le cartilage. De par cette nouvelle stimulation, les chondrocytes et les synoviocytes B vont

reprendre en main le phénomène de dégradation, stimuler la sécrétion de cytokines et augmenter la production enzymatique matricielle.

1.4.3.1. Dégradation enzymatique matricielle

La dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire est l'une des étapes clés dans l'OA. Ce sont les métallo-protéases et les cystéines protéases qui attirent actuellement l'attention des chercheurs pour essayer de comprendre et déceler la pathophysiologie de l'OA.

1.4.3.1.1. Les métallo-protéases

Les métallo-protéases jouent un rôle majeur dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Leur activité dépend du zinc et du calcium (McIlwraith 1996). Celles-ci sont produites sous l'effet des cytokines : l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α et vont altérer la composition de la matrice par la dégradation des fibres de collagène de type II et des agrécanes (Werb and Alexander 1994). Parmi les cascades enzymatiques stimulées, la voie la plus connue de dégradation cartilagineuse jusqu'à présent est celle des métallo-protéases (MP) (Werb et al 1994 ; Martel-Pelletier et al 2001). Les deux sortes de métallo-protéases impliquées dans la dégradation cartilagineuse sont les métallo-protéases de la matrice (MMP) et les adamalysines (ADAMS ou ADAMTS) (Martel-Pelletier *et al.* 2001).

• Les métallo-protéases matricielles

Les métallo-protéases matricielles (MMP) sont sécrétées sous la forme d'une enzyme inactive qui peut être activée *in vitro* par de nombreuses protéases naturelles (Caron 2003), cytokines pro-inflammatoires, hormones ou facteurs de croissance (Martel-Pelletier *et al.* 2001). Les MMP sont produites par les chondrocytes, les synoviocytes, les ostéoblastes, les macrophages et les fibroblastes (McIlwraith 1996). Il existe d'autres MMPs identifiés, mais leur fonction n'a pas encore été complètement élucidée (Martel-Pelletier *et al.* 2001). La production de la plupart des MMP dans le tissu conjonctif normal est mineure. En revanche, on en trouve des quantités importantes dans la matrice extracellulaire lésée lors d'inflammation, à un pH physiologique (Werb and Alexander 1994).

L'activité des MMP est spécifiquement diminuée par des molécules nommées inhibiteurs tissulaires des métallo-protéases (TIMPs). Les TIMPs sont régulés par les cytokines et synthétisés

par les synoviocytes, chondrocytes et les cellules endothéliales (Loeser 2005). Ils inactivent les MMP au niveau du complexe non-covalent. (Martel-Pelletier *et al.* 2001). Lors de maladies dégénératives comme l'OA, il se produit un débalancement entre la quantité des inhibiteurs de MMP et la quantité de MMP, résultant d'une déficience relative de ces inhibiteurs (Todhunter 1996). Plusieurs inhibiteurs chimiques non spécifiques ont été développés sur des modèles d'OA dans le but de contrôler l'activité catabolique des MMP et leur pathogénèse résultante, comme le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1ra) (Fernandes *et al.* 2002), la dehydroepiandrosterone (DHEA) (Wu *et al.* 2006), le licofelone (Moreau *et al.* 2006) ou la doxycycline (de Bri *et al.* 1998). Aucune de ces molécules n'a été commercialisée à ce propos, à cause des effets secondaires que pouvaient entraîner la prise des médicaments, sur les tissus sains environnants. Donc la recherche continue pour étudier le rôle des molécules qui peuvent prévenir la dégradation du cartilage articulaire pour que ce mécanisme d'inhibition puisse être validé sur des cas cliniques sans effets secondaires.

On distingue 4 sous-familles de MMP : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les matrylisines.

Dans le cartilage articulaire, les **collagénases** dégradent le collagène de type II dans la zone superficielle et les fibres péricellulaires (Wu *et al.* 2002). Il existe trois types identifiés de collagénases, responsables de la dégradation des fibres du collagène de type II, la collagénase-1 (MMP-1), la collagénase-2 (MMP-8), et la collagénase-3 (MMP-13). Les collagénases clivent le collagène en un site précis produisant deux fragments, l'un $\frac{3}{4}$ et l'autre $\frac{1}{4}$ de la structure primaire du collagène de type II. La collagénase-3 ou MMP-13 est celle ayant le plus d'affinité pour la dégradation des fibres de collagène de type II (Pelletier *et al.* 2001b). Chez le cheval des activités similaires ont été rencontrées pour ces trois collagénases : MMP-1, MMP-13 et MMP-8 (Brama *et al.* 2004; Clegg and Carter 1999; Tung *et al.* 2002).

Depuis 1996, plusieurs auteurs étudient la corrélation entre la pathophysiologie humaine et équine de l'OA en ce qui concerne les MMP. Ils approfondissent la pathophysiologie de l'OA, par l'étude de l'expression génique (Caron *et al.* 1996; Trumble *et al.* 2001) et de l'inhibition par la glucosamine des MMPs (Byron *et al.* 2003; Neil *et al.* 2005).

La deuxième famille de MMP est constituée par les gélatinases. Les **gélatinases A** (MMP-2) **et B** (MMP-9) ne sont pas présentes dans le cartilage articulaire sain. En revanche, elles sont impliquées dans les processus cataboliques. La gélatinase B est plus sélective au niveau

cartilagineux que la gélatinase A (Pelletier *et al.* 2001b). Toutes les deux participent à la dégradation des gélatines et des fibres de collagène de types IV et V (Martel-Pelletier *et al.* 2001). Leur particularité réside dans le fait qu'elles dégradent des protéines, comme le collagène de type II, déjà dénaturées par d'autres enzymes comme les collagénases, dans des sites non spécifiques. L'activité de ces deux gélatinases a été observée chez le cheval (Clegg and Carter 1999).

La troisième famille comprend les **stromélysines**. On retrouve la stromélysine-1 (MMP-3), la stromélysine-2 (MMP-10), la stromélysine-3 (MMP-11) et la matrilysine (MMP-7). Les stromélysines-1 et -2 dégradent la fibronectine, la laminine et les protéoglycanes. La stromélysine-1 ou MMP-3 est la seule qui a été trouvée à des niveaux significatifs dans le cartilage articulaire et qui ait été étudiée chez le cheval (Tung *et al.* 2002). Elle joue un rôle important dans la dégradation de fibres de collagène de type IX et dans l'activation enzymatique de la pro-collagénase (Pelletier *et al.* 2001b). Ces stromélysines dégradent les fibres de collagène, les protéoglycanes et les autres protéines mineures déjà lésées dans le cartilage (Caron 2003).

La dernière famille est constituée par les **matrylisines** (MMP-7), qui dénaturent les protéoglycanes. Elles ont été observées dans le cartilage humain et leur expression est augmentée par la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β (Martel-Pelletier *et al.* 2001).

En résumé, les MMP seraient les enzymes protéolytiques les plus importantes biologiquement quand à la dégradation matricielle lors d'OA. Les plus répandues et considérées d'importance majeure dans la progression des lésions d'OA sont les collagénases (MMP-13, MMP-1) et les stromélysines (MMP-3) (Moreau *et al.* 2006).

- **Adamlysines**

Également appelées agrécanases ou ADAMs (a disintegrin and metalloprotease), ces protéases se rapprochent de la structure et de la fonction des MMP, mais elles ont aussi des propriétés adhésives, jouant donc un rôle dans les interactions cellulaires. Elles sont aussi inhibées par des TIMPs. Certaines de ses enzymes dégradent l'aggrécane à des sites spécifiques dans le domaine interglobulaire G₁ et G₂. Des études *in vitro* ont également situé un autre site de clivage pour les agrécanases au niveau des sulfates de chondroïtine dans le domaine interglobulaire G₃ (Martel-Pelletier *et al.* 2001) (Figure 9).

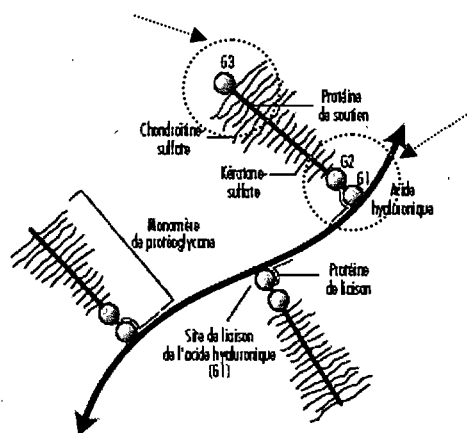


Figure 9 : Schéma d'un agrégat de protéoglycane et des domaines G₁, G₂, G₃ (Rühimäki and Vükari-Juntura 2000)

Il existe des nouveaux membres de cette famille appelés ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs). On retrouve deux sortes : aggrecanase-1 ou ADAMTS-4 et l'aggrecanase-2 ou ADAMTS-5. Les aggrecanases sont considérées comme le pivot dans la dégradation des protéoglycane (Martel-Pelletier *et al.* 2001).

1.4.3.1.2. Les cystéines protéases

Le deuxième groupe d'enzymes ayant un rôle important dans la dégradation enzymatique matricielle lors d'OA sont les cystéines protéases. Ce sont des enzymes qui ont pour composant principal un acide aminé appelé cystéine (McIlwraith 1996). Il existe plusieurs sortes de cystéines, parmi celles-ci deux groupes ont une importance relative dans la régulation du métabolisme cartilagineux : les **caspases** qui ont été citées antérieurement dans la section prolifération et mort des chondrocytes et les **cathepsines**.

Les cathepsines sont une grande famille d'enzymes lysosomiales de la famille des papaines (Yasuda *et al.* 2005). Il existe plusieurs types de cathepsines : B, L, H, K et S (Sandell and Hering 2001). Les cathepsines B et K sont les enzymes qui jouent un rôle plus important dans le métabolisme cartilagineux (Yasuda *et al.* 2005).

- **Cathepsine B**

Depuis 1970 des chercheurs étudient le rôle de cette enzyme dans la dégradation du cartilage. Elle se trouve dans les chondrocytes, où elle est synthétisée et stockée. Son usage

intracellulaire est essentiellement associé au phénomène physiologique de catabolisme cartilagineux (Hernandez-Vidal *et al.* 1998). Des études ont démontré que la cathepsine B dégrade des agrécanes (Soderstrom *et al.* 1999), les protéines de liaison (Nguyen *et al.* 1990) et des fibres de collagène de type I (Burleigh *et al.* 1974), II, IX, XI et X (Sires *et al.* 1995). Elle participe également au phénomène pathologique de dégradation cartilagineuse, comme activateur de pro-enzymes pour les pro-stromélysines, les pro-collagénases et les activateurs du plasminogène (Hernandez-Vidal *et al.* 1998). Actuellement, cette enzyme est moins étudiée dans la dégradation cartilagineuse, car il a été démontré que la cathepsine K, une autre cystéine protéase impliquée dans la dégradation protéique, a un pouvoir catabolique plus important (Gray *et al.* 2002; Morko *et al.* 2004).

• Cathepsine K

L'étude de la cathepsine K est plus récente comparativement à celle de la cathepsine B. Les premières publications sur cette enzyme datent des années 90. Plusieurs noms ont été donnés à cette protéase : cathepsine O, O2, K, X et OC2 (Drake *et al.* 1996). Finalement le comité de l'union internationale de la biochimie et biologie moléculaire lui a assigné le nom de cathepsine K. Elle est initialement transcrite et traduite comme un précurseur inactif, la procathepsine K (Figure 10). Cette enzyme s'autocatalyse à 4°C et à un pH de 4, et peut également être catalysée par une enzyme mature (McQueney *et al.* 1997).

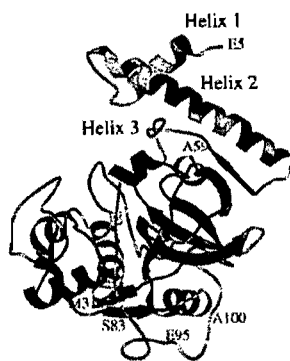


Figure 10 : Structure biochimique de la pro-cathepsine K (Frederick 2000).

On la détecte dans plusieurs tissus : cœur, placenta, poumon, intestin grêle, ovaires et appareil musculo-squelettique (Kafienah *et al.* 1998). Ceci a été confirmé à plusieurs reprises, par des tests d'expression génique comme l'hybridation *in situ* (Soderstrom *et al.* 1999), RT-PCR (Konttinen *et al.* 2002), Northern blot (Morko *et al.* 2004) et des techniques biochimiques de

détection protéique comme l'immunolocalization (Li *et al.* 2000), l'immunohistochimie (Pelletier *et al.* 2005) (Figure 11) et le Western blot (Kafienah *et al.* 1998).

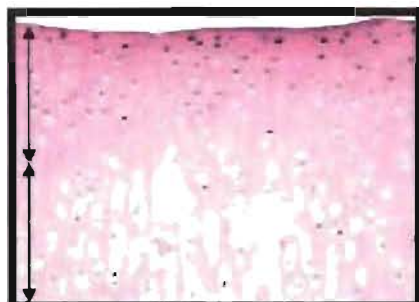


Figure 11 : Section de cartilage canin avec la représentation immunohistochimique de la cathepsine K (Pelletier *et al.* 2005).

La cathepsine K joue un rôle important dans la résorption de matrice osseuse. Une **surexpression** de la cathepsine K induit une dégradation des protéines osseuses comme l'ostéopontine, l'ostéonectine et les fibres de collagène de type I (Yamashita and Dodds 2000). Une telle dégénérescence osseuse se traduit par des maladies comme l'ostéoporose (Bossard *et al.* 1996). Contrairement, une **déficience** osseuse en cathepsine K, induit la pycnodysostose. Ce terme fait référence à une maladie génétique autosomale récessive qui est caractérisée par une fermeture prématurée des plaques de croissance; les ostéoclastes fonctionnent normalement pour déminéraliser l'os mais ne dégradent pas correctement la matrice extracellulaire (Yamashita and Dodds 2000). C'est pour cela que la cathepsine K représente une nouvelle cible moléculaire dans le traitement de telles maladies.

Dans le **cartilage**, on la retrouve dans les chondrocytes (Morko *et al.* 2005), la membrane synoviale (Dodds *et al.* 1999) et la jonction ostéo-chondrale (Gray *et al.* 2002). Son activité est intracellulaire et extracellulaire. Elle est située dans les lysosomes et dans la matrice extracellulaire (Soderstrom *et al.* 1999). La cathepsine K présente une activité collagénolytique (vis à vis de la triple hélice du collagène de type I et II) unique parmi les protéases à cystéine, mais aussi une activité gélatinolytique, générant de multiples fragments de collagène de 90 à 120 kDa à partir de la dégradation du collagène et dégradant le collagène déjà dénaturé par d'autres enzymes (Garnero *et al.* 1998; Kafienah *et al.* 1998). La cathepsine K présente ainsi une activité

puissante que les MMP, car celles-ci dégradent le collagène à un site spécifique seulement (Li *et al.* 2000).

L'activité collagénolytique de la cathepsine K va être stabilisée par la présence des sulfates de chondroïtine, plus spécifiquement la 4 (CS4); celles-ci augmentent 200 fois l'activité catabolique de la cathepsine K pendant toute sa vie et stabilisent l'activité de l'enzyme à un pH neutre (Li *et al.* 2000) (Figure 12). La cathepsine K dégrade également des agrégates et des protéines de liaison (Hou *et al.* 2003).

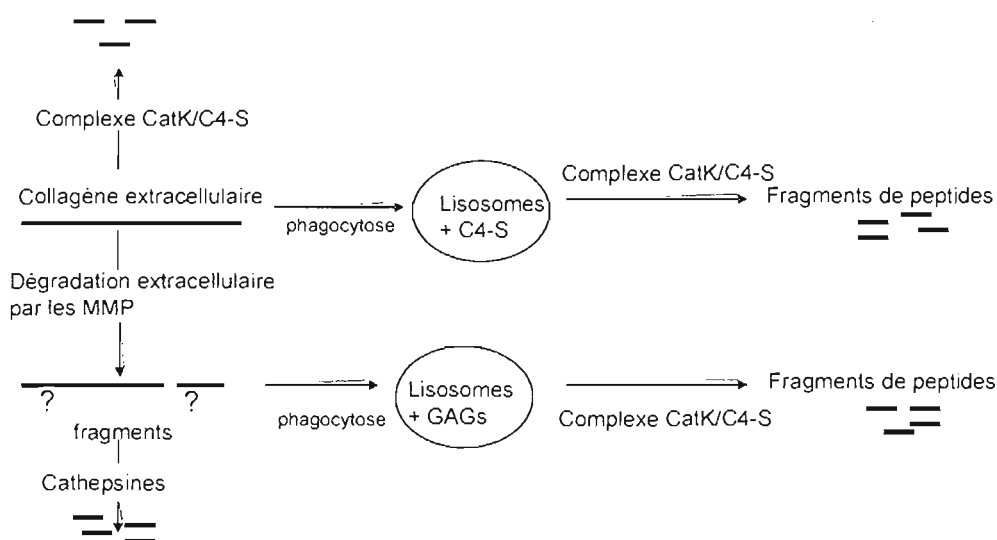


Figure 12 : Voie intracellulaire et extracellulaire de dégradation des cathepsines et MMPs et leur régulation par les glycosaminoglycanes – selon Li et al 2000.

Le **pH** est un des autres facteurs qui va influencer la stabilité de la cathepsine K. Celle-ci se stabilise à un pH acide (entre 4.5 et 6). Une corrélation entre le pH et le degré d'atteinte d'OA sur des patients humains opérés pour un placement de prothèse de hanche a permis de conclure qu'il y avait une corrélation positive entre l'augmentation de la sévérité de l'OA et l'acidité du milieu. Si on compare l'efficacité des enzymes protéolytiques et leur pH, on observe que les MMP ont besoin d'un pH neutre ou légèrement alcalin pour être actives, ce qui nous indique que pendant la progression de l'OA ou le pH s'acidifie, les collagenases et autres MMP, vont diminuer leur activité pendant que la cathepsine K va augmenter la sienne (Konttinen *et al.* 2002).

Des études génétiques ont permis de mieux comprendre le rôle de la cathepsine K dans le cartilage. Des groupes de souris génétiquement modifiées, par l'ajout de copies supplémentaires du gène murin de la cathepsine K (UTU17) ou par une délétion du collagène de type II (Del I) (remaniement chromosomique correspondant à la perte d'un fragment d'ADN de collagène de type II, prédisposant les souris à l'OA) ont été utilisés. Dans le premier cas, les souris présentaient une surexpression de cathepsine K (ARNm) et une susceptibilité à la synovite articulaire. Les souris présentaient une épaisseur et fibrose de la membrane synoviale ainsi qu'une dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Dans ce cartilage dégradé la cathepsine K était présente dans les chondrocytes et les cellules hypertrophiques de la membrane synoviale (Figure 13).

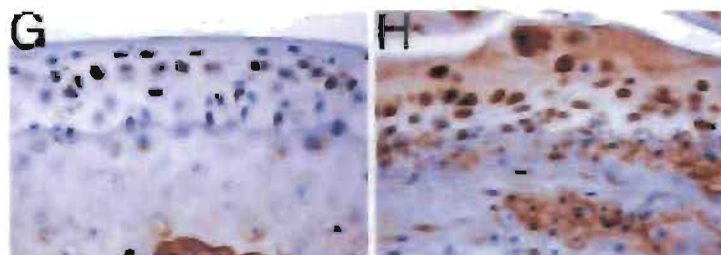


Figure 13 : Test immunohistochimique négatif sur du cartilage articulaire de souris saine (image de gauche) et test immunohistochimique positif sur du cartilage articulaire de souris génétiquement modifiée (UTU17) (image de droite) – selon Morko et al 2005.

Le deuxième groupe de souris exprimait plus précocement et en quantité plus importante la cathepsine K en comparaison aux autres cathepsines (B, H, L et S); la cathepsine K était présente dans les chondrocytes articulaires, la matrice du cartilage calcifié et les groupes de cellules prolifératives (Morko *et al.* 2005; Morko *et al.* 2004). Tous les résultats décrits ci-dessus indiquent que la cathepsine K pourrait avoir un rôle important dans le déclenchement de l'OA.

Jusqu'à présent aucune étude n'a démontré le rôle que pourrait jouer la cathepsine K dans la dégradation du cartilage équin lors d'OA. Chez le cheval les cathepsines K et B ont été soumises à des études sur leur localisation et leur activité dans les ostéoclastes équins. Il a été démontré que le phénomène catabolique de la cathepsine K était plus puissant que celui de la

cathepsine B. Une découverte fortuite a résulté de cette étude : la présence de cathepsine K dans les chondrocytes hypertrophiques (Gray *et al.* 2002).

Les inhibiteurs naturels de la cathepsine K font partie de la superfamille des cystatines. Dans ce groupe on retrouve trois sous-groupes importants: les cystatines, les stefines et les kininogènes. Leur classification se base sur leur structure, leur distribution dans le corps et leur rôle physiologique (Lecaille *et al.* 2007). La cystatine C semble jouer un rôle plus important que les autres en ce qui concerne l'inhibition de la cathepsine K dans les phénomènes musculo-squelettiques. Elle fait partie de la famille des cystatines et il a été démontré qu'une diminution de son activité contribue à un dommage cartilagineux plus important (Morko *et al.* 2004). Un autres inhibiteur non-spécifique, l'E64, est également utilisé dans de nombreuses études, mais son effet *in vivo* reste encore à déterminer (Kafienah *et al.* 1998). Finalement le licofelone, un anti-inflammatoire qui inhibe de façon compétitive la cyclooxygénase-1, la cycloxygénase-2, et le leucotriène-5, a été étudié sur un modèle d'OA basé sur des chiens ayant subi une transection du ligament croisé antérieur. Cet inhibiteur diminue la synthèse du nombre de facteurs cataboliques (ADAMTS-5, MMP-1, MMP-13) parmi lesquels se trouve la cathepsine K (Moreau *et al.* 2006; Pelletier *et al.* 2005; Pelletier *et al.* 2004).

En conclusion, les maladies inflammatoires et dégénératives des articulations consécutives au vieillissement ou à un traumatisme évoluent vers la destruction du cartilage, qui se traduit par un handicap sévère.

Aucun traitement efficace permettant la réparation de ce tissu n'est disponible actuellement, seulement la pose d'une prothèse chirurgicale chez l'humain (Savouret and Corvol 2006) ou l'arthrodèse de certaines articulations dans le cas du cheval peuvent diminuer la douleur dans les stades avancés d'OA (McIlwraith 1996).

Chapitre 2: Problématique et but de l'étude

2.1. Problématique de l'étude

Parmi les cascades enzymatiques, la voie la plus connue de dégradation cartilagineuse jusqu'à présent dans le processus d'OA, est celle des métalloprotéases. Ces enzymes sont étudiés depuis plusieurs années, mais aucun résultat concluant ressort de ces études. Actuellement une voie enzymatique alternative est étudiée : la voie de la cathepsine K.

2.2. Hypothèse

L'hypothèse nulle de cette étude est la relation inexistante entre la cathepsine K et son néoépitope avec le degré d'atteinte cartilagineuse lors d'ostéoarthrose chez le cheval; contrairement l'hypothèse alternative suggère que la cathepsine K est une des enzymes dégradant la matrice du cartilage articulaire dans le cas d'ostéoarthrose équine. De ce fait, elle utilise des mécanismes d'actions plus puissants et différents des déjà connues MMP.

2.3. Objectifs

Notre objectif premier est de déterminer et grader la dégradation cartilagineuse équine macroscopiquement et histologiquement avec deux colorations spécifiques : Safranine O-Fast green pour les protéoglycanes et Picrosirius red pour le collagène. Deuxièmement nous voulons déterminer et grader la localisation de la cathepsine K et des produits de dégradation générés par la cathepsine K dans le cartilage équin normal et ostéoarthrosique. Finalement le troisième objectif consistera à comparer et grader les fragments de dégradation du collagène produits par la cathepsine K avec les fragments de dégradation du collagène produits par les MMP.

Chapitre 3 : Article

Présentation sous forme d'article.

Article en préparation pour soumission à Osteoarthritis and Cartilage.

Evidence to suggest that cathepsin K degrades articular cartilage in naturally occurring equine osteoarthritis.

Tatiana Vinardell, DMV, IPSAV; Valeria Dejica, MD; Robin Poole, PhD; John Mort, PhD; Hélène Richard, TSA; Sheila Laverty, MVB, MRCVS, Diplomate ACVS, Diplomate ECVS

From the Département des Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Presented at the Canadian Arthritis Network 7th annual scientific conference in Halifax in October 2007

This work was supported by the Canadian Arthritis Network.

Address correspondence to Dr. Sheila Laverty
Département des Sciences Cliniques, Faculté de M edecine V et erinaire
Université de Montréal
C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Tel: [information retir ee / information withdrawn]

Fax: [information retir ee / information withdrawn]

Email: [information retir ee / information withdrawn]

3.1. Summary

Objective. The mechanisms leading to degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA) are complex and not yet fully understood. Cathepsin K (CK) is a cysteine protease which can also cleave the triple helix of type II collagen. This exposes a neoepitope that can now be identified by specific antibodies. The aim of this study was to obtain evidence suggesting a role for CK in naturally occurring equine OA in both lesional and peri-lesional regions.

Methods. Articular cartilages (n=12 horses; 5 healthy, 7 OA) were harvested from animals post-mortem. A gross macroscopic examination, histologic (Safranin O, Fast Green and Picrosirius red staining) and immunohistochemical evaluation were performed. Samples were divided into normal appearing cartilage, peri-lesional and lesional cartilage. Cartilage degradation in the samples was graded histologically and immunohistochemically. CK and possible CK cleavage were detected immunohistochemically with specific anti-protein and anti-neoepitope antibodies, respectively. A comparison of CK neoepitope (C2K) production with the collagenase-generated neoepitope produced by MMP-1, 8 and 13 (C2C) was also done using immunohistochemistry.

Results. CK and CK cleavage were significantly more abundant in OA cartilage (both peri-lesional and lesional) when compared to remote cartilage within the sample joint or cartilage from healthy joints. The immunohistochemical pattern observed for CK degradation (C2K) was similar to that of collagenase degradation (C2C). Macroscopic cartilage changes and histologic findings were significantly correlated with immunohistochemistry results.

Conclusion. The data generated suggests that CK may be involved in cartilage collagen degradation in naturally occurring osteoarthritis (OA).

Keywords- Horse, Cartilage, Cathepsin K, Osteoarthritis, Type II collagen.

3.2. Introduction

The progressive degeneration of articular cartilage is a hallmark feature in the pathogenesis of osteoarthritis (OA), and leads to a loss of joint function and to debilitating pain (Poole *et al.* 2002). The molecular mechanisms that lead to degeneration of the extracellular matrix of articular cartilage are complex and a number of enzymes and their interrelated pathways have been studied extensively (Pelletier *et al.* 2005). However the molecular characterization of OA remains incomplete.

The principal molecules of the extracellular matrix of articular cartilage are type II collagen and the proteoglycan aggrecan, together comprising 95% of its dry matter (Poole *et al.* 2001). Type II collagen, a major structural component of the extracellular matrix, is composed of three identical α -helical chains arranged in a triple helical structure (Alberts *et al.* 2002). The triple helix is cleaved by collagenases (MMPs) at a specific site to produce 3/4 and 1/4 fragments. MMP-1, 8, 13 and 14 are all capable of this cleavage but MMP-13 is currently believed to be the key player in type II collagen degradation in OA (Bluteau *et al.* 2001). These MMPs have been the focus of most of the protease-related studies of type II collagen cleavage in OA research in recent years (Hou *et al.* 2002).

Cathepsin K (CK), a cysteine protease, is synthesized by healthy and OA chondrocytes. It is now believed that this enzyme could play an important role in the breakdown of the cartilage collagen network in OA (Dejica *et al.* in press). Evidence from a study of the effects of an anti-inflammatory drug in an experimental model of OA also suggests an important role for CK in addition to the well-established role of MMPs, in cartilage degradation (Moreau *et al.* 2006). CK, like MMP collagenases, is capable of cleavage of the type II collagen triple helix. It subsequently cleaves at multiple sites within the triple helical region of both type I and II collagens. The primary specific cleavage site close to the N-terminus of its triple helix has been identified (Kafienah *et al.* 1998; Li *et al.* 2004) and a polyclonal antibody was raised against the C-terminus of this neoepitope termed C2K (Dejica *et al.* in press). The latter authors also showed that this neoepitope cannot be generated by collagenases and, conversely that CK cannot generate the collagenase neoepitope.

Recent data has shown that CK is expressed in OA cartilage (Morko *et al.* 2004). Transgenic D ϵ 11 mice models of OA exhibit up-regulation of CK expression in OA cartilage (Morko *et al.* 2005). This animal model harbours six additional copies of the 39kb murine gene

for type II collagen (*Col2a1*) carrying a short deletion mutation removing exon 7 and intron 7. This results in production of shortened pro α 1 (II) collagen chains incapable of fibril formation *in vivo* and consequently a greatly reduced collagen network in the cartilaginous extracellular matrix. Upon ageing the *De11* mice develop early-onset OA. The investigators observed CK in articular chondrocytes near sites of cartilage matrix destruction in the OA mice (Morko *et al.* 2005).

CK is now a target for disease modifying OA drugs (DMOADS) which means, therapies that can modify the disease, reducing proteolytic cartilage breakdown and/or stimulating matrix repair. We hypothesized that if CK is involved in cartilage degeneration then its expression and involvement in matrix degradation would correlate with the severity of cartilage degradation in naturally occurring OA, which would provide further evidence for its role in this disease.

Our objectives were to study CK expression and cleavage of type II collagen in healthy and naturally occurring equine OA cartilage, and compare this with type II collagen cleavage mediated by collagenases.

3.3. Methods

3.3.1. Cartilage specimens

Articular cartilage was aseptically harvested from the metacarpophalangeal joints (MCP) of 10 horses (5 healthy and 5 OA). These specimens were collected from an abattoir or from animals euthanized at the veterinary teaching hospital of the University of Montreal. In addition to the animals from the abattoir, material was harvested from 2 patients with OA diagnosed on a clinical examination. A 12 year old female was donated for euthanasia to the veterinary teaching hospital of the University of Montreal because of debilitating pain related to severe OA in both carpi. Clinical examination and radiographs confirmed the diagnosis and following euthanasia, cartilage was harvested from her carpi. A 7 y old crossbred gelding was presented for chronic forelimb lameness caused by proximal interphalangeal OA. On clinical examination the horse was lame (grade 4/5) and the diagnosis of OA was confirmed on radiographic evaluation. Cartilage was collected during a surgical arthrodesis to alleviate pain and restore function.

3.3.2. Specimen collection

The joints were opened and imaged with high-resolution digital photography (digital D1 Nikon camera, Tokyo, Japan) to document the macroscopic distribution of cartilage lesions. The lesions were also manually mapped and the joints were assessed for lesion extent with an assigned numeric score for severity, based on visual assessment (Table 1). A joint was considered an OA joint for the purposes of this study with a score ≥ 1 .

Full depth articular cartilage (to the calcified zone) was removed with a scalpel from the articular surfaces, within 5 h of death. A schematic drawing was made of the areas from which the cartilage was removed. Cartilage was harvested from the lesion (L), the area surrounding the lesion (peri-lesion, PL), and an area remote from the lesion, corresponding to an area of healthy appearing cartilage (remote, R) (Fig. 1). Cartilage was also harvested from corresponding areas of macroscopically healthy (lesion-free) joints.

3.3.3. Preparation of sections

Cartilage was embedded in optimal cutting temperature compound (OCT) (Tissue Tek, Sakura Finetek U.S.A., Inc. Torrance, CA, USA) and stored at -80°C until analysis. Full depth

cartilage sections of 5 μm thickness were cut with a cryostat (Leica CM 3050S). The cartilage sections were placed on slides coated with silane (Scientific Device Laboratory, Des plaines, IL, USA) which provided optimal adhesive qualities for performing immunohistochemical staining techniques. Samples from healthy cartilage were placed singly on each slide. When samples came from OA joints, the lesion, peri-lesion and remote specimens were all placed on the same slide allowing a direct comparison of stain uptake between sites, within the same joints.

3.3.4. Histologic grading

The sections were stained with Safranin O-Fast Green (SOFG), which stains glycosaminoglycans, and graded semi-quantitatively for degenerative changes with a modified Mankin grade (Mankin *et al.* 1971) (Table 2). Following grading, the joint compartment with evidence of most severe histological disease was selected for subsequent study and analysis. Sections were selected from the sites with the most severe lesions in the joints with OA confirmed on macroscopic examination.

Picrosirius red was employed to stain type II collagen in the samples. Briefly, it enhances collagen birefringence, and thus reveals the orientation of the collagen fibers in the various zones of the cartilage. Packing of collagen molecules and fiber thickness determine the polarization colours of Picrosirius red-stained collagens; thin fibers are green to yellowish-green and thicker fibers are yellowish-orange to red (Dayan *et al.* 1989). All frozen sections were stained as described previously (Hughes *et al.* 2005). The Picrosirius red stained sections were also graded for degenerative changes on examination with a Leica DM4000B polarized light microscope (PLM) equipped with interference filters and compensator plates mounted with a Leica DFC320 video camera (Table 3).

3.3.5. Immunohistochemistry

3.3.5.1. Antisera: C2K generated cleavage neopeptide in type II collagen

There is sequence identity between equine and human type II collagens (Richardson and Dodge 1997) at the primary site where the CK cleaves type II collagen (Kafienah *et al.* 1998) generating the GEAGKPG C-terminal neopeptide (termed C2K) which is recognized by a rabbit polyclonal antibody (Dejica *et al.* in press).

3.3.5.2. CK antiserum

As described previously for rat cathepsin K (Anway *et al.* 2004), a rabbit antiserum was prepared against a peptide-ovalbumin conjugate representing the C-terminal dodecapeptide-of human cathepsin K (Mort and Roughley 2004).

3.3.5.3. C2C mouse monoclonal antibody to collagenase generated cleavage neoepitope in type II collagen

This neoepitope resides at the C-terminus of this primary collagenase cleavage site (Poole *et al.* 2004). The antibody was generated in ascitic fluid in mice and purified by protein A-affinity chromatography (Hollander *et al.* 1994). The neoepitope is recognized by this antibody in multiple species including the horse (Poole *et al.* 2002).

3.3.6. Immunolocalization

The methods used in this study, were adapted from those used by Hollander *et al.* (Hollander *et al.* 1995). Briefly, frozen sections (5 μm) were fixed in 4% paraformaldehyde. After rinsing with phosphate buffered saline (PBS), sections were then treated with chondroitinase ABC in a humidified environment to enhance permeability of the extracellular matrix by removal of chondroitin sulphate. The sections were incubated with 0.2M EDTA to ensure removal of calcific deposits which otherwise non-specifically bind immunoglobulins. Localization by immunoperoxidase staining involved the use of primary antibody/antiserum each diluted in PBS (1/100) containing 1% wt/vol BSA (50 μl per section). Secondary antibody binding (1/700) was detected with streptavidin-peroxidase. The reagents were obtained from Dako Cedarlane (Hornby, Ontario, Canada). The peroxidase reaction was developed and the product enhanced with copper-H₂O₂/silver intensification as previously described (Gallyas and Merchenthaler 1988). Negative controls were included in the immunohistochemistry staining protocol for each batch. The secondary antibodies used in these studies for C2K and CK immunolocalizations were biotin-labelled polyclonal swine anti-rabbit antibody and for C2C a biotin-labelled polyclonal rabbit anti-mouse.

Semi-quantitative assessment of the immunohistochemical staining was performed using a modified scale adapted from Hollander *et al.* (Hollander *et al.* 1995) (Table 4).

3.3.7. Immunohistomorphometric analysis

The amount of CK was assessed semi-quantitatively by determining the number (percentage) of chondrocytes or lacunae that stained positively (Fig. 5). Each section was observed with a light microscope (x400; Labphot SA, Nikon, Japan) and divided into three macroscopic fields. All chondrocytes/lacunae were counted in each field. The results of three fields were averaged for each section. The total number of cells/lacunae that stained positively for CK was determined. The results are expressed as the percentage of cells that stained positively for CK (cell/lacuna score).

All slides were evaluated by two different observers, independently.

3.3.8. Statistical analysis

For paired comparisons in the same horses, between the remote, peri-lesion and lesion grades, a Wilcoxon signed rank test was employed. Differences between healthy and OA joints (remote, peri-lesion and lesion) from different animals were assessed by the Wilcoxon rank sum test.

Correlations between data groups were examined by employing a Spearman rank order correlation. A level of $P < 0.05$ was considered significant. All calculations were performed using commercially available software (NCSS 2004, Kaysville, UT, USA).

3.4. Results

3.4.1. Macroscopic findings

Healthy articular cartilage was opaque with a glistening smooth surface. In healthy joints, the macroscopic grade of the cartilage was 0. In OA joints the macroscopic grade ranged from 1 to 3; articular cartilage fibrillation, erosion and ulceration were observed (Fig. 1).

3.4.2. Histologic examination

3.4.2.1. Safranin O-Fast Green

Histologic appearance of the articular cartilage from healthy joints was consistent with healthy hyaline cartilage with an homogeneous uptake of the SOFG stain. In contrast, reduction of the staining, hypocellularity and ulceration was observed in the most severe OA cartilage sections (Fig. 2). Following observation of all SOFG specimens from the metacarpal bone, the carpus and the first phalanx (medial and lateral for each bone), we selected to study in all subsequent analysis the compartment with the greatest degeneration (highest modified Mankin grade); which provided a wide landscape of lesions. The modified Mankin grade ranged between 0 and 3 in cartilage sections from healthy joints, where grade 3 corresponded to a slight reduction of staining in the very superficial zone of the cartilage, and the presence of some cellular clones (Fig. 4). In the OA joints the histologic Mankin grade ranged from 0 to 5 at R sites, 2 to 7 in the PL area and from 3 to 10 in the L sample (Fig. 3). There was a statistically significance difference in histological grades between healthy specimens and PL and L sections of cartilage from OA joints ($P < 0.05$). Furthermore, in OA joint specimens, the histological grade was significantly higher in the cartilage L and PL when compared to the R site. The histological grade was also significantly higher in the L compared with the PL ($P < 0.05$) (Fig. 3).

3.4.2.2. Picrosirius red

Healthy sections had a predominance of aligned collagen fibers and homogeneous staining in comparison to OA cartilage. A loss of collagen structure with the presence of non-aligned fibers and heterogeneous staining progressed from the surface to the deeper zones of cartilage in OA specimens (Fig. 2). The pattern of staining also changed with the progression of the disease; in remote sites there was a homogenous pattern and fibers appeared densely packed with progressive degeneration of the ordered structure revealing individual collagen fibrils. In the

healthy and peri-lesion samples, fibril colour was orange, red and yellow, but with increased severity of the disease, we observed thinning of the fibrils with the colours changing to green or blue (Fig. 2).

The Picrosirius red grade was 0 in both healthy joint sections and in remote regions in OA joints. Grade 1 alone was attributed to peri-lesion sections and the grade ranged from 1 to 3 in OA lesions. The differences in grades between healthy and OA cartilage sections (lesion and peri-lesion) were statistically significant, and there was a significantly increased grade between the lesion vs. remote and peri-lesion and peri-lesion vs. remote sections in OA joints ($P < 0.05$) (Fig. 3).

3.4.3. Immunolocalization

3.4.3.1. C2K: Cleavage of type II collagen by CK

Healthy cartilage showed minimal immunostaining in the very superficial zone. An increase in stain occurred in sections from OA joints and with advanced disease (Fig. 4) and corresponded to the loss of SOFG staining. Overall, there was more staining, which was diffuse and localized in the matrix, in the most superficial cartilage where evidence of fibrillation or erosion was observed. The depth of staining increased with the severity of OA. In the most severe cases ($n = 2$) we observed staining of most of the extracellular matrix throughout the depth of the cartilage, combined with a loss of staining in the superficial zone associated with fibrillation (Fig. 4). The immunohistochemical grades of sections from healthy joints and in remote cartilage sections in OA joints ranged from 0 to 1. This increased to 2 in the peri-lesion area and from 2 to 4 in lesions. There was no statistically significant difference between immunostaining of sections from healthy joints and remote cartilage from OA joints but there was a statistically significant increase in stain in lesion and peri-lesion sections from OA joints when compared to remote cartilage from the same joint and to cartilage from healthy joints ($P < 0.05$). Finally the grade was significantly higher in the lesion compared to the peri-lesion sites ($P < 0.05$) (Fig. 3).

3.4.3.2. CK

Minimal immunostaining was visible in cartilage from healthy joints. In contrast strong staining was observed in lesion and peri-lesion sites from OA joints which corresponded to the loss of SOFG stain in the same sections of cartilage. The staining pattern was different to that

observed with C2K. CK staining was predominantly situated in chondrocytes in early stages of the disease; the increase and depth of the staining was focal and remained within the chondrocytes in the early stages of the disease. In the advanced stages in all the lesion sections hypocellularity and erosion were present and staining of the extracellular matrix was also observed. Overall the staining tended to be peri-cellular surrounding the lacunae (Fig. 4 and 5). The percentage of chondrocytes/lacuna stained from healthy joints sections was $\leq 20\%$, except for one case where it was 54%. In the remote sections from OA joints the staining pattern was similar to that observed in healthy cartilage. In specimens from peri-lesion and lesion sites percentage cell staining varied between 40% and 100%. The CK staining was significantly higher in peri-lesion and lesion sections from OA joints when compared to healthy joint sections and remote sections of the same joints ($P < 0.05$) (Fig. 3). The percentage of stained cells/ lacunae was also significantly higher in the lesion compared to peri-lesion ($P < 0.05$) (Fig. 3).

3.4.3.3. C2C: Cleavage of type II collagen by collagenases

The pattern of staining observed in healthy cartilage was similar to that observed for C2K. In the OA cartilage sections the depth of the staining increased with the severity of OA. In contrast to C2K, we did not observe grade 4 (corresponds to staining of most of the extracellular matrix throughout the depth of the cartilage, combined with a loss of staining in the superficial zone associated with fibrillation) in any of the sections (Fig. 4). The immunohistochemical grade of cartilage from healthy joints and of remote cartilage of OA joints ranged from 0 to 1. At peri-lesion sites the grade ranged from 0 to 2 and from 1 to 3 in the lesion (Table 4). The C2C immunostaining grade was significantly higher in the lesion when compared to the other sites within the OA joint and with healthy sections ($P < 0.05$) (Fig. 3).

Omission of primary antibody from the immunohistochemical procedure (C2K, C2C and CK) resulted in loss of immunostaining in all cases.

3.4.4. Correlations

The significant Spearman correlations between the various parameters assessed are shown in Table 5. C2K strongly correlated with the macroscopic grade, histologic grade and immunohistochemical grade for CK and C2C. CK staining also strongly correlated with the macroscopic and histologic grade ($P < 0.05$).

3.5. Discussion

In this study we provide evidence that CK expression is induced in association with macroscopic and histologically degenerate cartilage lesions in naturally occurring equine OA. Moreover, the CK generated cleavage neoepitope in type II collagen, which is not produced by collagenases (Dejica *et al.* in press), is also significantly increased and this correlated with the presence of CK and with the severity of cartilage degeneration. Furthermore, the pattern of degradation observed with CK was similar to and correlated with that observed with collagenases and the loss of Picrosirius red staining. Together these results suggest that CK degradation may, like collagenases, play an important role in cartilage matrix destruction and in the initiation and/or progression of OA.

We studied equine articular cartilage from animals with naturally occurring OA, which serves as a model for human disease. CK has been previously identified in cartilage in animal models of OA by others (Morko *et al.* 2005; Pelletier *et al.* 2005), but only some reports had identified the enzyme (Konttinen *et al.* 2002) and its products of degradation in naturally occurring OA (Dejica *et al.* in press).

The spectrum of lesions available for study within the OA joints, including lesion, perilesion and remote cartilage with a normal macroscopic appearance provided a landscape of cartilage matrix changes corresponding to both the early and later advanced lesions of OA. The model of OA employed herein mimics the human studies previously carried out by Squires *et al.* (Squires *et al.* 2003) in which they provided the first molecular evidence to suggest that the development of OA involves the formation and spread of focal lesions of OA. They also provided evidence that increased collagenase activity was an important component of this process.

Cartilage, samples were harvested in the lesion, adjacent to and remote from the lesion and they exhibited a gradient of histologic change, molecular damage and altered synthesis from healthy cartilage to the lesion. We found a similar correlation with both histologic and immunostaining techniques but this time studying CK degradation. Squires *et al.* observed a decrease in type II collagen content and an increase in collagenase activity in the cartilage harvested from areas adjacent to the lesion. Picrosirius red staining in the present study revealed a disorganization of the collagen structure and thinning of the type II collagen fibrils in the perilesion site. Similarly on Safranin O-Fast green sections hypocellularity, progressive loss of proteoglycans from the superficial zone to the deepest zone and cartilage fibrillation were

observed with progressive severity of degradation, confirming the disease status of the sections studied.

However, an increase in putative CK activity in the cartilage, assessed by the presence of the C2K neoepitope, was observed in the very superficial zone in the remote site and the pattern of staining increased with the degree of disease, progressing deeper into the cartilage sections. This pattern of surface degradation progressing deeper into the tissues is similar to that observed by others (Hollander *et al.* 1995) and would further support the hypothesis that cartilage degradation begins at the articular surface. It is interesting that the immunohistochemical pattern we observed for CK degradation (C2K) in this study correlated with that due to collagenase degradation (C2C). We also observed in some samples C2K staining of most of the extracellular matrix through the depth of the cartilage, combined with a loss of staining in the superficial zone associated with fibrillation (grade 4). According to Hollander and collaborators grade 4 may represent severely damaged matrix in which the collagen neoepitopes have been lost from damaged molecules, at the articular surface.

The present work demonstrates a combination of activity of both collagenases and CK in OA cartilage. CK has previously been shown to be active at both acid and neutral pH (Konttinen *et al.* 2002). However MMP are only active at neutral or even slightly alkaline pH (Werb and Alexander 1994). Konttinen and collaborators have shown that progression of the disorganization of the superficial articular hyaline cartilage in OA is associated with progressively increasing H^+ concentrations. Furthermore, they observed that CK extracted from normal appearing articular hyaline cartilage which exhibited a neutral matrix pH was in the latent, high molecular weight pro form, whereas CK in OA cartilage, with low matrix pH, was in the active, proteolytically processed, low molecular weight form (Konttinen *et al.* 2002). They postulated that as the pH falls, OA progresses and while MMP are decreasingly active, CK is increasingly active. Combining our results with previous studies, we postulate that CK is active concurrently with MMP, but when the pH is low, MMP activity may decrease while CK continues to degrade cartilage in an acidic environment. This could explain the similar patterns of staining we observed; grade 4 was observed on C2K stained sections alone and overall immunostaining grades were lower for the MMP products of degradation (C2C) in our samples.

Results of previously published investigations illustrate the ability of CK to degrade both type II collagen and aggrecan in articular cartilage (Hou *et al.* 2001; Kafienah *et al.* 1998).

Recent evidence also has shown that the collagenolytic activity of CK in human cartilage is enhanced by glycosaminoglycans (GAGs), more specifically, chondroitin and keratan sulphate molecules (Li *et al.* 2004). These GAGs are easily liberated by CK activity from aggrecan aggregates or cartilage and can subsequently form complexes with CK (Hou *et al.* 2003). The complex exhibits potent triple helical collagen degrading activity, whereas monomeric CK has no collagenase activity, they also increase the pH stability of the enzyme at neutral pH. This means that collagen is accessible to degradation by CK complexes at both neutral and acidic pH (Li *et al.* 2000).

It is important to point out that the observed pattern of CK immunostaining revealed some interesting insights into the enzyme's presence with disease progression. Staining was first observed in the cells in the remote sections in OA joints but minimally in normal healthy joints and with progression of the disease, peri-cellular staining around chondrocytes became evident with a spread of the stain into the extracellular matrix. This could indicate that chondrocytes are the source of CK and furthermore that it is released from the cells with progression of the disease. The present observations are in agreement with those of Morko and coworkers, who observed the same pattern of staining in a mouse model of OA (Morko *et al.* 2004). They detected an increase in the number of CK positive cells in articular cartilage, particularly in the vicinity of articular defects in early OA lesions. The same pattern of staining was observed in bovine articular cartilage explants stimulated with TNF- α and oncostatin M. High immunoreactivity of CK in the extracellular matrix was observed in stimulated chondrocytes and without stimulation the enzyme was present intracellularly stored in the lysosomes (Sondergaard *et al.* 2006).

Overall, these complex observations provide new and interesting insights for the potential role of CK in naturally occurring OA. CK has been previously identified at the osteochondral junction in early hypertrophic chondrocytes (Gray *et al.* 2002) in healthy foetal or juvenile equine cartilage samples. It is known that type X collagen expression is associated with hypertrophic chondrocytes in normal cartilage but is also associated with an altered phenotype in OA cartilage (Grant 2007). We postulate that the expression of CK in OA cartilage may also reflect an alteration in phenotype toward a more hypertrophic profile, similar to that observed for type X collagen.

Finally Dejica and collaborators (Dejica *et al.* in press) studied the involvement of CK in human OA. They also studied CK products of degradation and observed that C2K increased with

age in articular cartilage and that it was significantly elevated in OA cartilages compared to adult non-arthritic cartilages. Also in cartilage explants from OA patients, the generation of the neoepitope was significantly reduced in culture by a very selective non-toxic inhibitor of CK.

The results presented here demonstrate that cartilage matrix degeneration, the presence of CK in equine OA cartilage and type II collagen cleavage are closely correlated. Consequently we postulate that CK has an important role in cartilage degradation in naturally occurring OA in addition to collagenases. All this data suggests that CK should be considered as a possible target for drug development for the inhibition of cartilage degradation in OA.

3.6. Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Guy Beauchamp and Dr Bruce Murphy for technical assistance with this project. This work was supported by the Canadian Arthritis Network. Tatiana Vinardell was recipient of a trainee award from the Canadian Arthritis Network and the Arthritis Society of Canada. Sheila Laverty is funded by the Canadian Arthritis Network. John Mort and Robin Poole were funded by the Shriners Hospitals.

3.7. References

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) Cell junctions, cell adhesion and the extracellular matrix. In: *Molecular biology of the cell*, 4 edn., Eds: B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, GS, New York. pp 1065-1125.
- Anway, M.D., Wright, W.W., Zirkin, B.R., Korah, N., Mort, J.S. and Hermo, L. (2004) Expression and localization of cathepsin k in adult rat sertoli cells. *Biology of reproduction* **70**, 562-569.
- Bluteau, G., Conrozier, T., Mathieu, P., Vignon, E., Herbage, D. and Mallein-Gerin, F. (2001) Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochimica et biophysica acta* **1526**, 147-158.
- Dayan, D., Hiss, Y., Hirshberg, A., Bubis, J.J. and Wolman, M. (1989) Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* **93**, 27-29.
- Gallyas, F. and Merchenthaler, I. (1988) Copper-H₂O₂ oxidation strikingly improves silver intensification of the nickel-diaminobenzidine (Ni-DAB) end-product of the peroxidase reaction. *J Histochem Cytochem* **36**, 807-810.
- Grant, M.E. (2007) From collagen chemistry towards cell therapy - a personal journey. *International journal of experimental pathology* **88**, 203-214.
- Gray, A.W., Davies, M.E. and Jeffcott, L.B. (2002) Localisation and activity of cathepsins K and B in equine osteoclasts. *Res Vet Sci* **72**, 95-103.
- Hollander, A.P., Heathfield, T.F., Webber, C., Iwata, Y., Bourne, R., Rorabeck, C. and Poole, A.R. (1994) Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest* **93**, 1722-1732.
- Hollander, A.P., Pidoux, I., Reiner, A., Rorabeck, C., Bourne, R. and Poole, A.R. (1995) Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* **96**, 2859-2869.

- Hou, W.S., Li, W., Keyszer, G., Weber, E., Levy, R., Klein, M.J., Gravallesse, E.M., Goldring, S.R. and Bromme, D. (2002) Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* **46**, 663-674.
- Hou, W.S., Li, Z., Buttner, F.H., Bartnik, E. and Bromme, D. (2003) Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biological chemistry* **384**, 891-897.
- Hou, W.S., Li, Z., Gordon, R.E., Chan, K., Klein, M.J., Levy, R., Keysser, M., Keyszer, G. and Bromme, D. (2001) Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *The American journal of pathology* **159**, 2167-2177.
- Hughes, L.C., Archer, C.W. and ap Gwynn, I. (2005) The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *Eur Cell Mater* **9**, 68-84.
- Kafienah, W., Bromme, D., Buttle, D.J., Croucher, L.J. and Hollander, A.P. (1998) Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J* **331 (Pt 3)**, 727-732.
- Konttinen, Y.T., Mandelin, J., Li, T.F., Salo, J., Lassus, J., Liljestrom, M., Hukkanen, M., Takagi, M., Virtanen, I. and Santavirta, S. (2002) Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **46**, 953-960.
- Lavery, S., Okouneff, S., Ionescu, M., Reiner, A., Pidoux, I., Webber, C., Rossier, Y., Billingham, R.C. and Poole, A.R. (2002) Excessive degradation of type II collagen in articular cartilage in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **20**, 1282-1289.
- Li, Z., Hou, W.S. and Bromme, D. (2000) Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry* **39**, 529-536.
- Li, Z., Yasuda, Y., Li, W., Bogyo, M., Katz, N., Gordon, R.E., Fields, G.B. and Bromme, D. (2004) Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **279**, 5470-5479.
- Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L. and Zarins, A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *The journal of bone and joint surgery* **53**, 523-537.

- Moreau, M., Boileau, C., Martel-Pelletier, J., Brunet, J., Laufer, S. and Pelletier, J.P. (2006) Licofelone reduces progression of structural changes in a canine model of osteoarthritis under curative conditions: effect on protease expression and activity. *J Rheumatol* **33**, 1176-1183.
- Morko, J., Kiviranta, R., Joronen, K., Saamanen, A.M., Vuorio, E. and Salminen-Mankonen, H. (2005) Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Arthritis Rheum* **52**, 3713-3717.
- Morko, J.P., Soderstrom, M., Saamanen, A.M., Salminen, H.J. and Vuorio, E.I. (2004) Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **63**, 649-655.
- Mort, J.S. and Roughley, P.J. (2004) Production of antibodies against degradative neopeptides in aggrecan. *Methods in molecular medicine* **100**, 237-250.
- Pelletier, J.P., Boileau, C., Boily, M., Brunet, J., Mineau, F., Geng, C., Reboul, P., Laufer, S., Lajeunesse, D. and Martel-Pelletier, J. (2005) The protective effect of licofelone on experimental osteoarthritis is correlated with the downregulation of gene expression and protein synthesis of several major cartilage catabolic factors: MMP-13, cathepsin K and aggrecanases. *Arthritis Res Ther* **7**, R1091-1102.
- Poole, A.R., Ionescu, M., Fitzcharles, M.A. and Billingham, R.C. (2004) The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *Journal of immunological methods* **294**, 145-153.
- Poole, A.R., Kobayashi, M., Yasuda, T., Lavery, S., Mwale, F., Kojima, T., Sakai, T., Wahl, C., El-Maadawy, S., Webb, G., Tchetina, E. and Wu, W. (2002) Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**, ii78-81.
- Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Lavery, S. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, S26-33.
- Richardson, D.W. and Dodge, G.R. (1997) Cloning of equine type II procollagen and the modulation of its expression in cultured equine articular chondrocytes. *Matrix Biol* **16**, 59-64.

- Sondergaard, B.C., Henriksen, K., Wulf, H., Oestergaard, S., Schurigt, U., Brauer, R., Danielsen, I., Christiansen, C., Qvist, P. and Karsdal, M.A. (2006) Relative contribution of matrix metalloprotease and cysteine protease activities to cytokine-stimulated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 738-748.
- Squires, G.R., Okouneff, S., Ionescu, M. and Poole, A.R. (2003) The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 1261-1270.
- Werb, Z. and Alexander, C.M. (1994) Proteinases and matrix degradation. In: *Arthritis and Surgery*, Eds: C.B. Sledge, S. Rudoly, E.D. Harris and W.N. Kelley, W.B.Saunders Company, Philadelphia. pp 102-122.

3.8. Figure and table legends

Figure 1

Representative OA lesion on the distal metacarpus illustrating 3 sites from which cartilage was harvested postmortem: L = lesion, PL = adjacent to the lesion, and R = remote from the lesion.

Figure 2

Representative cartilage histologic sections from 3 sites in OA joints: remote (R), peri-lesion (PL) and lesion (L). A, Safranin O-Fast Green (SOFG) (stains proteoglycan) stained sections showed a reduction of the staining, hypocellularity and loss of cartilage thickness with the progression of OA. B, Picrosirius red staining (stains collagen) illustrated non-aligned fibers and heterogeneous staining with the progression of the disease from the surface to the deeper zones of cartilage (original magnification x 50, bar = 100 μ m).

Figure 3

Vertical scatter plot illustrating comparisons between the histological and immunohistochemical assessments of cartilage sections from healthy (H) and OA joints: remote cartilage (R), peri-lesion (PL) and in the lesion (L). * $P < 0.05$ vs. N; § $P < 0.05$ vs. R; ¶ $P < 0.05$ vs. PL.

Figure 4

Immunohistochemically stained representative sections of articular cartilage from 3 sites within OA joints (remote (R), peri-lesion (PL) and lesion (L)). For C2K immunolocalization (CK collagen cleavage) and C2C immunolocalization (MMPs collagen cleavage) we observed an increase in stain in OA sections and the depth of the staining increased with the severity of OA. CK immunolocalization was situated in chondrocyte lacunae and surrounding matrix. Brown colour represents positive staining (original magnification x 50, bar = 100 μ m).

Figure 5

Representative patterns of staining with CK at higher magnification. There is an absence of staining in cartilage sections from healthy joints (H) and from remote sites in OA (R): a progressive increase of CK staining was observed in chondrocyte lacunae and surrounding matrix

with increasing severity of the disease. PL illustrates a peri-lesion and L a lesion sample (original magnification x 50, bar = 100 μ m).

Table 5

Spearman rank correlations between immunohistochemical grades, macroscopic joint grades and histologic grades. Macro: Macroscopic grade. SOFG: Modified Mankin grade. C2K: immunohistochemical grade for type II collagen cleavage by Cathepsin K. C2C: immunohistochemical grade for type II collagen cleavage by collagenases (MMP). Cathepsin K: immunohistochemical grade for cathepsin K localization.

Figure 1

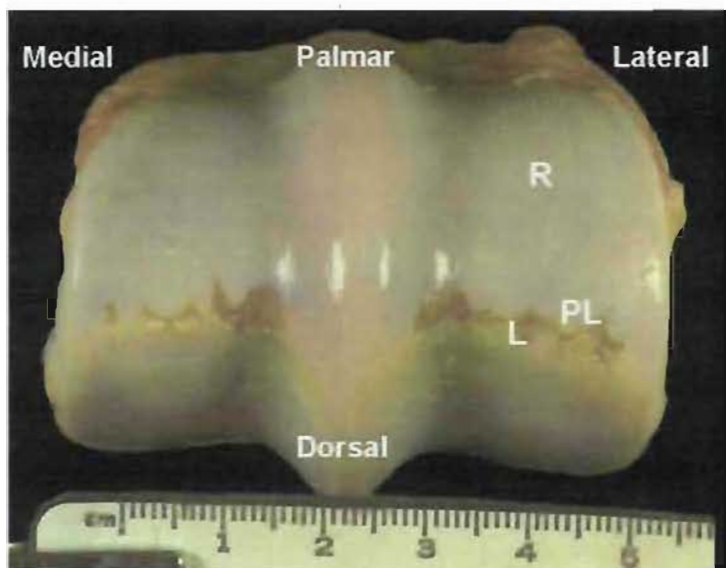


Figure 2

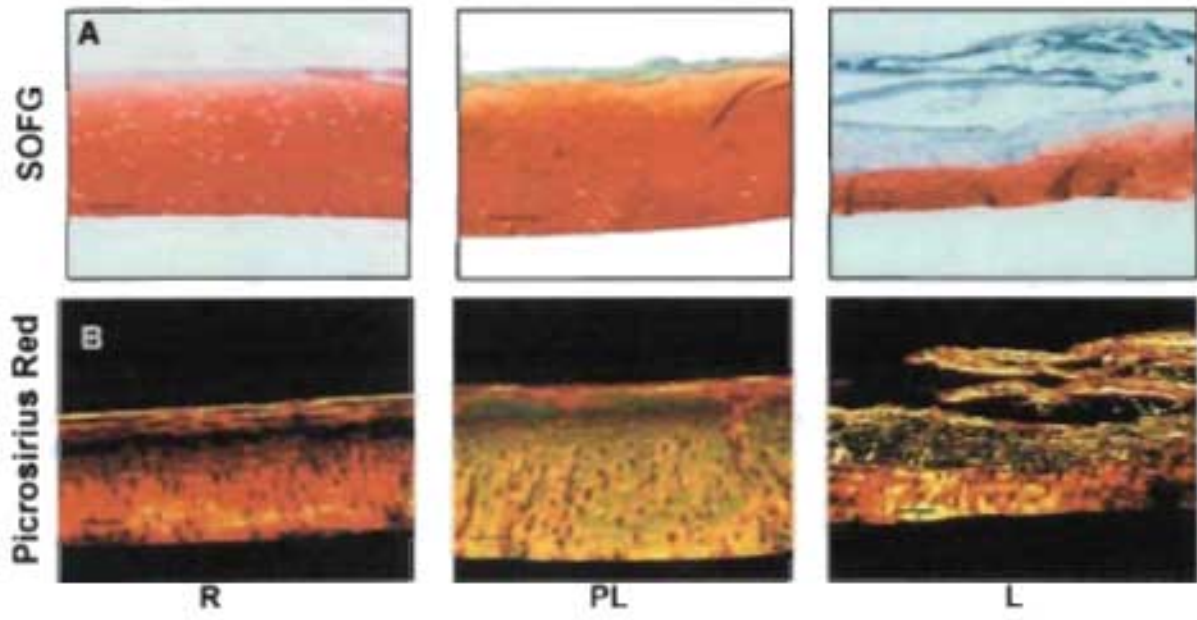


Figure 4

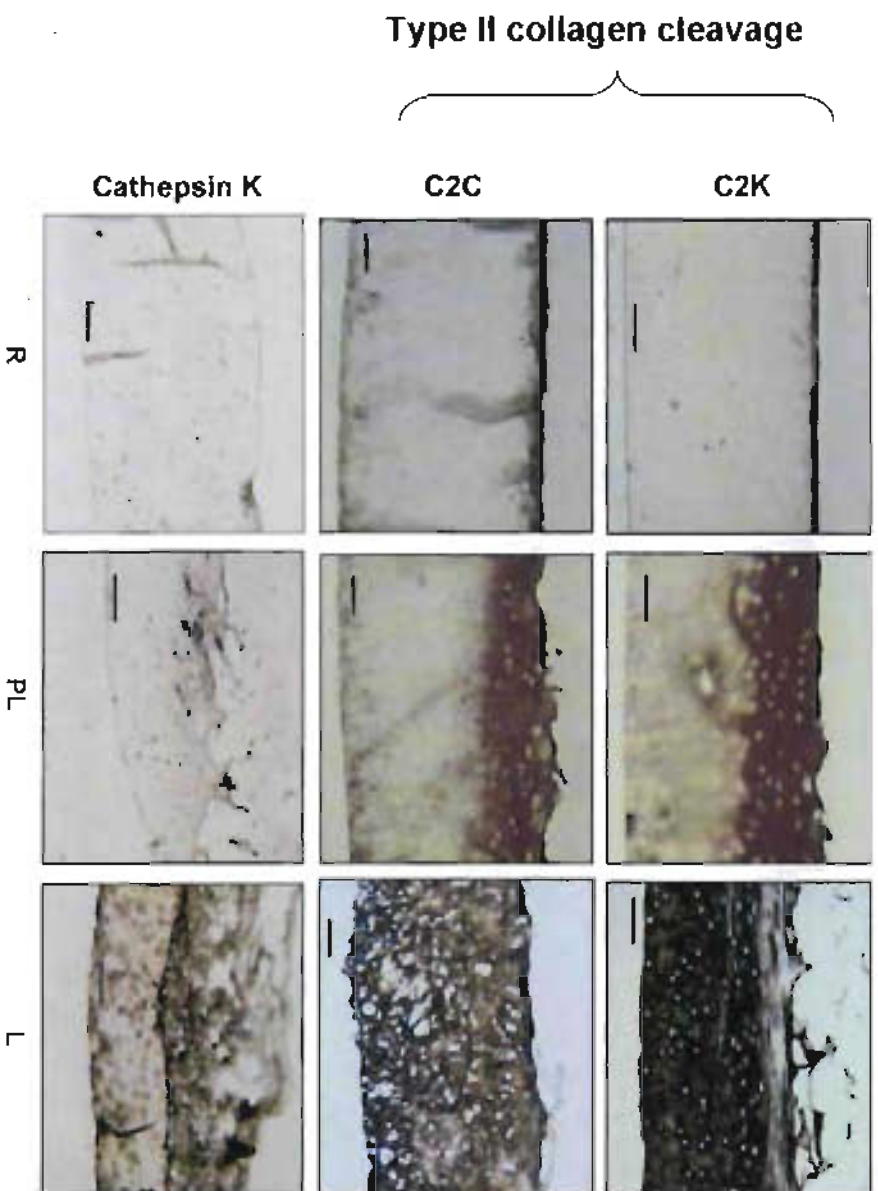


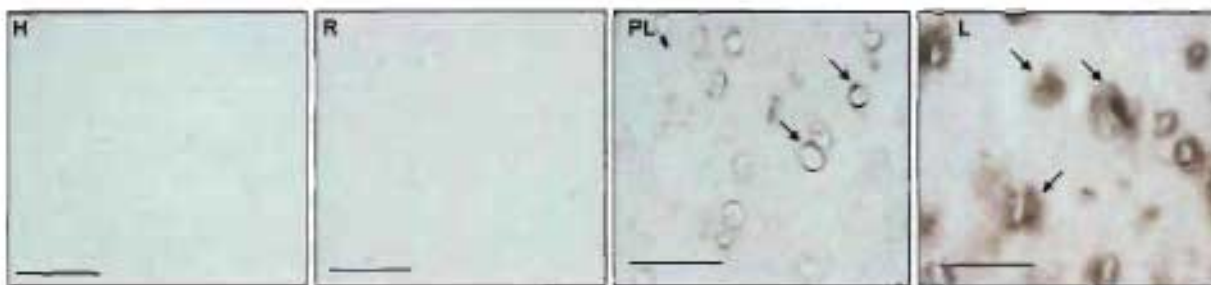
Figure 5

Table 1

Normal	0
Fibrillation	1
Erosion	2
Ulceration	3

Table 2

Table 2	
Modified Mankin grade (Safranin O-Fast Green)	
Structure	
Normal	0
Surface irregularities	1
Fibrillation or clefts	2
Erosion up to 1/3 of cartilage thickness	3
Erosion up to 2/3 of cartilage thickness	4
Erosion > 2/3 of cartilage thickness (Including complete ulceration)	5
Cells	
Normal	0
Clusters	1
Hypocellularity	2
Safranin O staining	
Normal	0
Slight reduction	1
Moderate reduction	2
Severe reduction	3

Table 3

Table 3
Collagen structural grade (Picrosirius Red)

Normal	0
Loss of integrity of 1/3 of cartilage thickness	1
Loss of integrity of 1/3 of cartilage thickness	2
Loss of integrity of 1/3 of cartilage thickness	3

Table 4

No staining	0
Staining in the superficial layer	1
Superficial and midzone staining	2
Deep zone staining	3
Staining of most of the extracellular matrix throughout the depth of the cartilage, combined with a loss of staining in the superficial zone associated with fibrillation	4

Table 5

Table 5
Spearman Rank correlations

C2K	r	p
Macro	0.84	0.0005
SOFG	0.83	0.0006
Picrosirius Red	0.78	0.002
C2C	0.73	0.006
Cathepsin K	0.82	0.0009
C2C	r	p
Macro	0.76	0.003
SOFG	0.82	0.001
Picrosirius Red	0.72	0.008
Cathepsin K	r	p
Macro	0.85	0.0004
SOFG	0.81	0.001
Picrosirius Red	0.77	0.003
C2C	0.83	0.0007
Picrosirius Red	r	p
Macro	0.93	0.00001
SOFG	0.79	0.001
SOFG	r	p
Macro	0.76	0.003

Chapitre 4: Discussion

Nous avons démontré dans cette étude que la cathepsine K (CK) et son produit de dégradation (C2K) se retrouvent dans le cartilage équin atteint d'ostéoarthrose (OA). Leurs présences sont significativement corrélées avec le degré d'atteinte cartilagineuse. De plus, la dégradation du cartilage par la CK semble similaire à celle observée par les collagénases. En combinant ces résultats, nous pensons que la CK possède un rôle important dans la progression de l'OA.

Nous avons étudié le cartilage articulaire provenant de chevaux atteints d'OA naturelle. Le collagène de type II équin et humain sont dégradés par la CK au même site de clivage. Nos résultats sont donc également importants pour la recherche sur l'OA humaine. Cette enzyme a déjà été étudiée dans des modèles expérimentaux d'OA canine (Pelletier *et al.* 2005) et murine (Morko *et al.* 2005). En revanche peu d'études existent sur la CK (Konttinen *et al.* 2002) et ses produits de dégradation (Dejica *et al.* in press) en ce qui concerne l'OA naturelle.

Dans notre étude nous avons observé, au sein d'une même articulation atteinte d'OA, différents degrés de dommages cartilagineux. Nous avons choisi d'étudier le cartilage provenant du centre de la lésion, du pourtour de la lésion et d'un site distant de la lésion chez des chevaux atteints d'OA pour observer la progression de la maladie au sein d'une même articulation. Squires et collaborateurs ont démontré que l'OA commençait par la formation d'une lésion focale puis par son extension; ils ont également prouvé que les MMP étaient des enzymes clés dans ce processus (Squires *et al.* 2003). Dans leur étude, les échantillons cartilagineux étaient prélevés au centre de la lésion, au pourtour de la lésion et à distance de la lésion. Ils ont observé au niveau histologique et moléculaire une altération progressive de la synthèse cartilagineuse entre les échantillons sains et ceux provenant de la lésion. Ils ont suggéré également que la maladie se propageait progressivement à l'extérieur de la lésion focale et elle finissait par atteindre tout le cartilage environnant. Nous avons trouvé une corrélation similaire dans notre étude avec les techniques histologiques et immunohistochimiques mais cette fois ci en étudiant la CK. Ceci nous porte à penser que la CK possède également un rôle important dans le processus dégénératif. Squires et collaborateurs ont observé que le cartilage provenant des régions environnant la lésion présentaient une diminution du contenu en fibres de collagène de type II et une augmentation de l'activité des collagénases.

Dans notre étude nous avons détecté avec la coloration de Picosirius red une désorganisation et un amincissement des fibres de collagène de type II dans les échantillons qui provenaient du pourtour de la lésion. Egalement avec Safranine O-Fast green, nous avons observé de l'hypocellularité, une perte progressive de protéoglycanes de la zone la plus superficielle à la plus profonde et une perte de structure du cartilage. Les colorations de Safranine O-Fast green et Picosirius red ont confirmé la progression des changements structuraux avec la progression de la maladie et l'état de dégénérescence des échantillons.

L'augmentation d'activité de la CK, évaluée par la présence de son néoépitope, était observée dans la zone la plus superficielle sur les échantillons prélevés à distance de la lésion. La coloration augmentait en profondeur avec le degré d'atteinte cartilagineuse. Le patron de coloration immunohistochimique observé pour C2K dans cette étude était corrélé de façon très intéressante avec les produits de dégradation des collagénases (C2C). Précédemment décrit par Hollander (Hollander *et al.* 1995) dans les stades précoces d'OA, la dégradation du collagène par les collagénases se produit dans la partie la plus superficielle du cartilage et progresse dans la profondeur de celui-ci. Nous avons observé les mêmes résultats dans notre étude avec la détection de C2C et également le même patron de coloration pour C2K. Ces résultats suggèrent que la CK, comme les collagénases, est impliquée dans la dégradation cartilagineuse. En effet, sur des échantillons colorés pour détecter C2K, nous avons observé une coloration de la plus part de la matrice extracellulaire jusqu'à la zone la plus profonde du cartilage, combinée avec une perte de coloration de la zone superficielle et la présence de fibrillation. Cette description correspond au grade 4 décrit par Hollander et collaborateurs et représente une atteinte sévère de la matrice où les produits de dégradation de la couche superficielle ont disparu.

Cette étude nous a également permis de montrer la combinaison d'activité des deux enzymes (MMP et CK) dans un cartilage atteint d'OA. Une étude précédente portant sur du cartilage humain atteint d'OA a souligné que la progression de la maladie dans la partie superficielle du cartilage articulaire était associée avec une augmentation progressive de la charge en protons (H^+). La CK est active à un pH neutre ou acide (Sondergaard *et al.* 2006) alors que les MMP sont actives à un pH neutre ou légèrement alcalin (Werb and Alexander 1994). Ceci indique que lorsque les MMP diminuent leur activité, celle de la CK est en progression (Kontinen *et al.* 2002).

En combinant nos résultats avec ceux provenant des études sur le pH, nous postulons que la CK est active en même temps que les MMP. Cependant, à un moment donné, le pH devient trop acide et les MMP arrêtent de dégrader le cartilage alors que la CK continue son activité. Ceci permettrait d'expliquer les différences de grades observées entre les néoépitoques C2K et C2C.

La capacité de la CK à dégrader les composants majeurs de la matrice cartilagineuse comme le collagène de type II et les aggrecanes est établie depuis plusieurs années (Hou *et al.* 2001; Kafienah *et al.* 1998). Récemment, il a été démontré que l'activité collagenolytique de la CK était augmentée avec la combinaison de molécules de chondroïtine-4 sulphate. Ce complexe augmente donc l'activité de l'enzyme et potentialise la dégradation de la triple hélice de collagène (Li *et al.* 2002). La chondroïtine-4 sulphate augmente la stabilité de l'enzyme à pH neutre, donc ceci signifie que l'enzyme peut dégrader le collagène à un pH neutre (Li *et al.* 2000) ou acide (Sondergaard *et al.* 2006).

Dans nos sections cartilagineuses, nous avons détecté la présence de la CK et nous avons observé un patron de coloration très intéressant avec la progression de la maladie. En effet, dans les échantillons prélevés à distance de la lésion, la CK était localisée dans les chondrocytes. Ensuite, la coloration devenait péri-cellulaire pour les échantillons prélevés au pourtour de la lésion. Ceci signifie que les chondrocytes sont la source de CK. Avec la progression de la maladie, l'enzyme sort des cellules pour aller dégrader la matrice extracellulaire. Ces observations sont en accord avec les données de Morko et collaborateurs. Ces auteurs ont obtenu le même patron de coloration avec des souris transgéniques qui ont servi de modèle animal d'OA (Morko *et al.* 2004). Ils ont détecté une augmentation du nombre de chondrocytes colorés par la CK dans les stades précoces d'OA. Egalement, une autre équipe de chercheurs a observé sur des explants de cartilage bovins stimulés avec le TNF- α et l'oncostatine M, une coloration importante pour la CK dans la matrice extracellulaire. Pour le cartilage non-stimulé, l'enzyme se trouvait dans les cellules, à l'intérieur des lysosomes (Sondergaard *et al.* 2006).

Les résultats de cette étude nous apportent une information supplémentaire sur le rôle de la CK dans la dégradation du cartilage articulaire atteint d'OA naturelle. Dejica et collaborateurs (Dejica *et al.* in press) ont étudié le rôle de la présence de C2K dans l'OA humaine. C2K augmentait avec l'âge dans le cartilage articulaire normal et il y avait un niveau significativement élevé du néoépitoque dans le cartilage atteint d'OA comparativement à un cartilage sain.

Egalement dans des explants cartilagineux, ils ont démontré une diminution significative de C2K par l'ajout d'un inhibiteur spécifique non-toxique de la CK.

Les résultats présentés ici montrent que la dégénérescence de la matrice et la présence de la CK dans le cartilage équin atteint d'OA sont inter-reliées. Ces résultats sont très intéressants mais de nombreuses questions sur l'activation de la CK persistent encore. Cette enzyme ne semble pas suivre le schéma pathophysiologique déjà élucidé pour les collagénases. Nous avons observé dans notre laboratoire que stimuler des explants cartilagineux sains et atteints d'OA avec l'IL-1 β n'augmentait pas la concentration du néoépitope C2K. Comme décrit précédemment, Sondergard et collaborateurs ont obtenu sur des explants de cartilage bovin sain stimulés avec le TNF- α et l'oncostatin M, une augmentation de l'enzyme (Sondergaard *et al.* 2006). Cependant, le néoépitope ne fut pas détecté dans cette étude. Les travaux de recherche doivent donc se poursuivre pour tenter d'approfondir nos connaissances sur ce qui déclenche l'activation de l'enzyme dans le cartilage sain et atteint d'OA.

La production des néoépitopes reste également à éclaircir. En effet, l'activité enzymatique spécifique de la CK sur le collagène de type II n'est pas bien définie. Nous savons que cette enzyme a une activité collagénolytique très importante et qu'elle dégrade le collagène de type II en un site particulier (Kafienah *et al.* 1998). L'enzyme présente également divers degrés d'affinité pour les différents agencements d'acides aminés qui composent le collagène de type II (Kafienah *et al.* 1998); cette dégradation spécifique pourrait donc exposer des nouveaux produits de dégradation. Actuellement nous tentons dans notre laboratoire d'identifier et de caractériser les fragments produits par la CK pour ainsi pouvoir utiliser de nouveaux biomarqueurs, spécifiques de la CK autres que C2K. Grâce à ces nouveaux biomarqueurs, il serait possible à partir de cultures d'explants de chevaux atteints d'OA de mesurer l'efficacité d'inhibiteurs spécifiques de la CK. Des résultats positifs nous permettraient de faire un pas en avant et de considérer cette enzyme comme une cible thérapeutique potentielle permettant d'enrayer la maladie.

Cette étude présente néanmoins certaines limitations. En effet, le fait d'utiliser du cartilage provenant de chevaux qui présentaient la maladie de façon naturelle fait de cette étude une étude descriptive. Une autre façon, bien que plus coûteuse, de répondre à l'hypothèse de départ aurait été d'utiliser des souris transgéniques qui développent des lésions d'OA de façon

précoce. Ainsi, on aurait pu observer si ces souris produisaient le néoépitope. Ceci nous aurait permis d'obtenir des résultats directs de cause à effet.

Une autre limitation de cette étude concerne le faible nombre de chevaux utilisé et l'hétérogénéité de l'échantillon. Cependant, en vue des résultats positifs et répétables que nous avons obtenus, nous n'avons pas jugé nécessaire d'augmenter la taille de l'échantillon. Même si cette étude présente des limitations, nous pensons que cette étude descriptive sur la présence de l'enzyme et de son néoépitope apporte des nouvelles connaissances sur l'enzyme dans l'OA naturelle.

Conclusion :

Notre hypothèse de travail est validée: La présence de la CK et de son néoépitope sont donc bien reliées à la présence de lésions cartilagineuses observées lors d'OA naturelle équine, identifiées histologiquement par le grade de Mankin (gold standard de l'évaluation du cartilage atteint d'OA). Ces résultats indiquent que la CK, au même titre que les collagénases, est une enzyme importante dans la dégradation cartilagineuse.

L'étape suivante est de démontrer que l'inhibition sélective de la CK permettrait de diminuer significativement la dégradation matricielle. Si tel est le cas, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de la CK pourrait représenter une stratégie thérapeutique prometteuse pour un grand nombre de patients et d'animaux atteints d'OA.

Bibliographie

- Adams, O.K. (1990) Affection dégénérative articulaire. In: *Les boiteries du cheval*, Ed: Maloine, Paris. pp 106-108.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) Cell junctions, cell adhesion and the extracellular matrix. In: *Molecular biology of the cell*, 4 edn., Eds: B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, GS, New York. pp 1065-1125.
- Anway, M.D., Wright, W.W., Zirkin, B.R., Korah, N., Mort, J.S. and Hermo, L. (2004) Expression and localization of cathepsin k in adult rat sertoli cells. *Biology of reproduction* **70**, 562-569.
- Auer, D.E., Ng, J.C. and Seawright, A.A. (1993) Free radical oxidation products in plasma and synovial fluid of horses with synovial inflammation. *Aust Vet J* **70**, 49-52.
- Bird, J.L., May, S. and Bayliss, M.T. (2000) Nitric oxide inhibits aggrecan degradation in explant cultures of equine articular cartilage. *Equine Vet J* **32**, 133-139.
- Blaney Davidson, E.N., van der Kraan, P.M. and van den Berg, W.B. (2007) TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*.
- Bluteau, G., Conrozier, T., Mathieu, P., Vignon, E., Herbage, D. and Mallein-Gerin, F. (2001) Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochimica et biophysica acta* **1526**, 147-158.
- Bolam, C.J., Hurtig, M.B., Cruz, A. and McEwen, B.J. (2006) Characterization of experimentally induced post-traumatic osteoarthritis in the medial femorotibial joint of horses. *Am J Vet Res* **67**, 433-447.
- Bossard, M.J., Tomaszek, T.A., Thompson, S.K., Amegadzie, B.Y., Hanning, C.R., Jones, C., Kurdyla, J.T., McNulty, D.E., Drake, F.H., Gowen, M. and Levy, M.A. (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* **271**, 12517-12524.
- Brama, P.A., Barneveld, A., Karssenbergh, D., Van Kampen, G.P. and van Weeren, P.R. (2001) The application of an indenter system to measure structural properties of articular cartilage in the horse. Suitability of the instrument and correlation with biochemical data. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **48**, 213-221.
- Brama, P.A., van den Boom, R., DeGroot, J., Kiers, G.H. and van Weeren, P.R. (2004) Collagenase-1 (MMP-1) activity in equine synovial fluid: influence of age, joint pathology, exercise and repeated arthrocentesis. *Equine Vet J* **36**, 34-40.

- Brommer, H., van Weeren, P.R. and Brama, P.A. (2003) New approach for quantitative assessment of articular cartilage degeneration in horses with osteoarthritis. *Am J Vet Res* **64**, 83-87.
- Buckwalter, J.A., Martin, J. and Mankin, H.J. (2000) Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* **49**, 481-489.
- Burleigh, M.C., Barrett, A.J. and Lazarus, G.S. (1974) Cathepsin B1. A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem J* **137**, 387-398.
- Byron, C.R., Orth, M.W., Venta, P.J., Lloyd, J.W. and Caron, J.P. (2003) Influence of glucosamine on matrix metalloproteinase expression and activity in lipopolysaccharide-stimulated equine chondrocytes. *Am J Vet Res* **64**, 666-671.
- Caron, J.P. (2003) Osteoarthritis. In: *Diagnosis and management of lameness in the horse*, Eds: M.W. Ross and S.J. Dyson, Saunders, St Louis. pp 572-591.
- Caron, J.P., Tardif, G., Martel-Pelletier, J., DiBattista, J.A., Geng, C. and Pelletier, J.P. (1996) Modulation of matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) gene expression in equine chondrocytes by interleukin 1 and corticosteroids. *Am J Vet Res* **57**, 1631-1634.
- Clegg, P.D. and Carter, S.D. (1999) Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases. *Equine Vet J* **31**, 324-330.
- Clyne, M.J. (1987) Pathogenesis of degenerative joint disease. *Equine Vet J* **19**, 15-18.
- Cormack, D.H. (1993) Dense connective tissue, cartilage, bone, and joints. In: *Essential Histology*, J.B. Lippincott Company edn., Ed: R. Winters, Philadelphia.
- Dayan, D., Hiss, Y., Hirshberg, A., Bubis, J.J. and Wolman, M. (1989) Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* **93**, 27-29.
- de Bri, E., Lei, W., Svensson, O., Chowdhury, M., Moak, S.A. and Greenwald, R.A. (1998) Effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on spontaneous osteoarthritis in guinea pigs. *Adv Dent Res* **12**, 82-85.
- Dewire, P. and Einhorn, T.A. (2001) The joint as an organ. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management*, 3rd edn., Eds: R.W. Moskowitz, D.S. Howell, R.D. Altman, J.A. Buckwalter and V.M. Goldberg, W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 49-68.
- Dodds, R.A., Connor, J.R., Drake, F.H. and Gowen, M. (1999) Expression of cathepsin K messenger RNA in giant cells and their precursors in human osteoarthritic synovial tissues. *Arthritis Rheum* **42**, 1588-1593.

- Drake, F.H., Dodds, R.A., James, I.E., Connor, J.R., Debouck, C., Richardson, S., Lee-Rykaczewski, E., Coleman, L., Rieman, D., Barthlow, R., Hastings, G. and Gowen, M. (1996) Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* **271**, 12511-12516.
- Ekman, S., Skioldebrand, E., Heinegard, D. and Hultenby, K. (2005) Ultrastructural immunolocalisation of bone sialoprotein in the osteocartilagenous interface of the equine third carpal bone. *Equine Vet J* **37**, 26-30.
- Eurell, J.A.C. and Van Sickle, D.C. (1998) Connective and supportive tissues. In: *Textbook of Veterinary Histology*, 5 edn., Eds: H.D.Dellmann, J.A.Eurell, Williams and Wilkins, Baltimore. pp 32-61.
- Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J. and Pelletier, J.P. (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* **39**, 237-246.
- Frederick, K. (2000) Procathepsin K...Life in the pits, Ed: Biochemistry, Lincoming College.
- Frisbie, D.D. (2006) Synovial Joint Biology and Pathobiology. In: *Equine Surgery*, 3 edn., Eds: J.A. Auer and J.A. Stick, Saunders, St.Louis. pp 1036-1055.
- Furst, D.E. and Hillson, J. (2001) Aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs. In: *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*, 14 edn., Ed: W.J. Koopman, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 665-716.
- Gallyas, F. and Merchenthaler, I. (1988) Copper-H₂O₂ oxidation strikingly improves silver intensification of the nickel-diaminobenzidine (Ni-DAB) end-product of the peroxidase reaction. *J Histochem Cytochem* **36**, 807-810.
- Garcia-Seco, E., Wilson, D.A., Cook, J.L., Kuroki, K., Kreeger, J.M. and Keegan, K.G. (2005) Measurement of articular cartilage stiffness of the femoropatellar, tarsocrural, and metatarsophalangeal joints in horses and comparison with biochemical data. *Vet Surg* **34**, 571-578.
- Garnero, P., Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F.H., McQueney, M.S., Foged, N.T., Delmas, P.D. and Delaisse, J.M. (1998) The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* **273**, 32347-32352.
- Ge, Z., Hu, Y., Heng, B.C., Yang, Z., Ouyang, H., Lee, E.H. and Cao, T. (2006) Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum* **55**, 493-500.
- Genevois, J.P. (1992) Anatomie et physiologie articulaire. In: *Encyclopédie vétérinaire*, Techniques S.A. edn., Ed: H. Laforge, Paris.
- Goldring, M.B. (2000) The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 1916-1926.

- Goodrich, L.R. and Nixon, A.J. (2006) Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* **171**, 51-69.
- Gouttenoire, J., Valcourt, U., Ronziere, M.C., Aubert-Foucher, E., Mallein-Gerin, F. and Herbage, D. (2004) Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage. *Biorheology* **41**, 535-542.
- Grant, M.E. (2007) From collagen chemistry towards cell therapy - a personal journey. *International journal of experimental pathology* **88**, 203-214.
- Gray, A.W., Davies, M.E. and Jeffcott, L.B. (2002) Localisation and activity of cathepsins K and B in equine osteoclasts. *Res Vet Sci* **72**, 95-103.
- Gregg, A.J., Fortier, L.A., Mohammed, H.O., Mayr, K.G., Miller, B.J. and Haupt, J.L. (2006) Assessment of the catabolic effects of interleukin-1beta on proteoglycan metabolism in equine cartilage cocultured with synoviocytes. *Am J Vet Res* **67**, 957-962.
- Grodzinsky, A.J., Levenston, M.E., Jin, M. and Frank, E.H. (2000) Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. *Annu Rev Biomed Eng* **2**, 691-713.
- Hernandez-Vidal, G., Jeffcott, L.B. and Davies, M.E. (1998) Immunolocalization of cathepsin B in equine dyschondroplastic articular cartilage. *Vet J* **156**, 193-201.
- Hollander, A.P., Heathfield, T.F., Webber, C., Iwata, Y., Bourne, R., Rorabeck, C. and Poole, A.R. (1994) Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest* **93**, 1722-1732.
- Hollander, A.P., Pidoux, I., Reiner, A., Rorabeck, C., Bourne, R. and Poole, A.R. (1995) Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* **96**, 2859-2869.
- Hou, W.S., Li, W., Keyszer, G., Weber, E., Levy, R., Klein, M.J., Gravallesse, E.M., Goldring, S.R. and Bromme, D. (2002) Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* **46**, 663-674.
- Hou, W.S., Li, Z., Buttner, F.H., Bartnik, E. and Bromme, D. (2003) Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biological chemistry* **384**, 891-897.
- Hou, W.S., Li, Z., Gordon, R.E., Chan, K., Klein, M.J., Levy, R., Keysser, M., Keyszer, G. and Bromme, D. (2001) Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *The American journal of pathology* **159**, 2167-2177.
- Hough, A.J. (2001) Pathology of Osteoarthritis. In: *Arthritis and Allied Conditions. A textbook of Rheumatology*, 14 edn., Ed: W.J. Koopman, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 2167-2194.

- Hughes, L.C., Archer, C.W. and ap Gwynn, I. (2005) The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *Eur Cell Mater* **9**, 68-84.
- Huser, C.A. and Davies, M.E. (2007) Calcium signaling leads to mitochondrial depolarization in impact-induced chondrocyte death in equine articular cartilage explants. *Arthritis Rheum* **56**, 2322-2334.
- Huser, C.A., Peacock, M. and Davies, M.E. (2006) Inhibition of caspase-9 reduces chondrocyte apoptosis and proteoglycan loss following mechanical trauma. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 1002-1010.
- Hyllested, J.L., Veje, K. and Ostergaard, K. (2002) Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage--a review. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 333-343.
- Jasin, H.E. (2001) Mechanism of tissue damage in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*, 14 edn., Ed: W.J. Koopman, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 1128-1152.
- Jeffcott, L.B., Rosedale, P.D., Freestone, J., Frank, C.J. and Towers-Clark, P.F. (1982) An assessment of wastage in thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine Vet J* **14**, 185-198.
- Kafienah, W., Bromme, D., Buttle, D.J., Croucher, L.J. and Hollander, A.P. (1998) Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J* **331 (Pt 3)**, 727-732.
- Kawcak, C.E., McIlwraith, C.W., Norrdin, R.W., Park, R.D. and James, S.P. (2001) The role of subchondral bone in joint disease: a review. *Equine Vet J* **33**, 120-126.
- Kim, D.Y., Taylor, H.W., Moore, R.M., Paulsen, D.B. and Cho, D.Y. (2003) Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. *Vet J* **166**, 52-57.
- Kontinen, Y.T., Mandelin, J., Li, T.F., Salo, J., Lassus, J., Liljestrom, M., Hukkanen, M., Takagi, M., Virtanen, I. and Santavirta, S. (2002) Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **46**, 953-960.
- Kurz, B., Lemke, A.K., Fay, J., Pufe, T., Grodzinsky, A.J. and Schunke, M. (2005) Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann Anat* **187**, 473-485.
- Lalmanach, G., Diot, E., Godat, E., Lecaille, F. and Herve-Grepinet, V. (2006) Cysteine cathepsins and caspases in silicosis. *Biol Chem* **387**, 863-870.
- Laufer, S. (2003) Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 623-627.

- Lavery, S., Stover, S.M., Belanger, D., O'Brien, T.R., Pool, R.R., Pascoe, J.R., Taylor, K. and Harrington, T. (1991) Radiographic, high detail radiographic, microangiographic and histological findings of the distal portion of the tarsus in weanling, young and adult horses. *Equine Vet J* **23**, 413-421.
- Lavigne, P., Benderdour, M., Lajeunesse, D., Reboul, P., Shi, Q., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J. and Fernandes, J.C. (2005) Subchondral and trabecular bone metabolism regulation in canine experimental knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 310-317.
- Lecaille, F., Bromme, D. and Lalmanach, G. (2007) Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie*.
- Lejeune, J.P., Serteyn, D., Gangl, M., Schneider, N., Deby-Dupont, G., Deberg, M. and Henrotin, Y. (2007) Plasma concentrations of a type II collagen-derived peptide and its nitrated form in growing Ardenner sound horses and in horses suffering from juvenile digital degenerative osteoarthropathy. *Veterinary research communications* **31**, 591-601.
- Li, Z., Hou, W.S. and Bromme, D. (2000) Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry* **39**, 529-536.
- Li, Z., Hou, W.S., Escalante-Torres, C.R., Gelb, B.D. and Bromme, D. (2002) Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate. *J Biol Chem* **277**, 28669-28676.
- Li, Z., Yasuda, Y., Li, W., Bogyo, M., Katz, N., Gordon, R.E., Fields, G.B. and Bromme, D. (2004) Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **279**, 5470-5479.
- Loeser, R.F. (2005) The biology of osteoarthritis. In: *56th Annual meeting of the american college of veterinary pathologist and 40th Annual meeting of the american society for veterinary clinical pathology* American college of veterinary pathologist and American society for veterinary clinical pathology Boston.
- Loeser, R.F. (2006) Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* **54**, 1357-1360.
- Loeulle, D. (2004) Arthrose et Os sous chondral mythe ou réalité ? In: *XVIII journée scientifique du GRIO*, Ed: G.d.R.d.I.s. l'Ostéoporose, Paris.
- Lozada, C.J. and Altman, R.D. (2001) Management of osteoarthritis. In: *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*, 14 edn., Ed: W.J. Koopman, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 2246-2263.
- Mankin, H.J. and Brandt, K.D. (1992) Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*, 2 edn.,

Eds: R.W. Moskowitz, D.S. Howell, R.D. Altman, J.A. Buckwalter and V.M. Goldberg, W.B.Saunders, Philadelphia. pp 109-154.

- Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L. and Zarins, A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *The journal of bone and joint surgery* **53**, 523-537.
- Martel-Pelletier, J., Alaaeddine, N. and Pelletier, J.P. (1999) Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* **4**, D694-703.
- Martel-Pelletier, J., Welsch, D.J. and Pelletier, J.P. (2001) Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **15**, 805-829.
- Massicotte, F., Lajeunesse, D., Benderdour, M., Pelletier, J.P., Hilal, G., Duval, N. and Martel-Pelletier, J. (2002) Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 491-500.
- McIlwraith, C.W. (1996) General pathobiology of the joint and response to injury. In: *Joint disease in the horse*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B.Saunders, Philadelphia. pp 40-70.
- McQueney, M.S., Amegadzie, B.Y., D'Alessio, K., Hanning, C.R., McLaughlin, M.M., McNulty, D., Carr, S.A., Ijames, C., Kurdyla, J. and Jones, C.S. (1997) Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem* **272**, 13955-13960.
- Meyer, U. and Wiesmann, H.P. (2006) Bone and Cartilage Engineering. In: *Bone and Cartilage*, Ed: G. Schröder, Springer, Heidelberg. pp 7-43.
- Moreau, M., Boileau, C., Martel-Pelletier, J., Brunet, J., Laufer, S. and Pelletier, J.P. (2006) Licofelone reduces progression of structural changes in a canine model of osteoarthritis under curative conditions: effect on protease expression and activity. *J Rheumatol* **33**, 1176-1183.
- Morko, J., Kiviranta, R., Joronen, K., Saamanen, A.M., Vuorio, E. and Salminen-Mankonen, H. (2005) Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Arthritis Rheum* **52**, 3713-3717.
- Morko, J.P., Soderstrom, M., Saamanen, A.M., Salminen, H.J. and Vuorio, E.I. (2004) Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **63**, 649-655.
- Mort, J.S. and Roughley, P.J. (2004) Production of antibodies against degradative neopeptides in aggrecan. *Methods in molecular medicine* **100**, 237-250.

- Mow, V.C. and Ratcliffe, A. (1997) Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: *Basic Orthopaedic Mechanism*, 2 edn., Ed: W.C. Hayes, Lippincott-Raven, Philadelphia. pp 113-177.
- Muir, P., McCarthy, J., Radtke, C.L., Markel, M.D., Santschi, E.M., Scollay, M.C. and Kalscheur, V.L. (2006) Role of endochondral ossification of articular cartilage and functional adaptation of the subchondral plate in the development of fatigue microcracking of joints. *Bone* **38**, 342-349.
- Naumann, A., Dennis, J.E., Awadallah, A., Carrino, D.A., Mansour, J.M., Kastenbauer, E. and Caplan, A.I. (2002) Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem* **50**, 1049-1058.
- Neil, K.M., Orth, M.W., Coussens, P.M., Chan, P.S. and Caron, J.P. (2005) Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on mediators of osteoarthritis in cultured equine chondrocytes stimulated by use of recombinant equine interleukin-1beta. *Am J Vet Res* **66**, 1861-1869.
- Nguyen, Q., Mort, J.S. and Roughley, P.J. (1990) Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem J* **266**, 569-573.
- Palmer, J.L. and Bertone, A.L. (1996) Joint biomechanics in the pathogenesis of traumatic arthritis. In: *Joint disease in the horse*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B.Saunders, Philadelphia. pp 104-119.
- Pelletier, J.P., Boileau, C., Boily, M., Brunet, J., Mineau, F., Geng, C., Reboul, P., Laufer, S., Lajeunesse, D. and Martel-Pelletier, J. (2005) The protective effect of licofelone on experimental osteoarthritis is correlated with the downregulation of gene expression and protein synthesis of several major cartilage catabolic factors: MMP-13, cathepsin K and aggrecanases. *Arthritis Res Ther* **7**, R1091-1102.
- Pelletier, J.P., Boileau, C., Brunet, J., Boily, M., Lajeunesse, D., Reboul, P., Laufer, S. and Martel-Pelletier, J. (2004) The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone* **34**, 527-538.
- Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J. and Abramson, S.B. (2001a) Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* **44**, 1237-1247.
- Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J. and Howell, D.S. (2001b) Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*, Ed: W.J. Koopman, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 2195-2215.
- Pool, R.R. (1996) Patologic manifestations of joint disease in the athletic horse. In: *Joint disease in the horse*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders, Philadelphia. pp 87-104.

- Poole, A.R. (2001) Cartilage in health and disease. In: *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*, 14 edn., Ed: W.J. Koopman, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 226-284.
- Poole, A.R., Ionescu, M., Fitzcharles, M.A. and Billingham, R.C. (2004) The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *Journal of immunological methods* **294**, 145-153.
- Poole, A.R., Kobayashi, M., Yasuda, T., Lavery, S., Mwale, F., Kojima, T., Sakai, T., Wahl, C., El-Maadawy, S., Webb, G., Tchetina, E. and Wu, W. (2002) Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**, ii78-81.
- Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Lavery, S. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, S26-33.
- Poole, A.R., Nelson, F., Dahlberg, L., Tchetina, E., Kobayashi, M., Yasuda, T., Lavery, S., Squires, G., Kojima, T., Wu, W. and Billingham, R.C. (2003) Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochem Soc Symp*, 115-123.
- Radin, E.L. (1999) Subchondral bone changes and cartilage damage. *Equine Vet J* **31**, 94-95.
- Radin, E.L. (2001) Structure and function of joints. In: *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*, 14 edn., Ed: W.J. Koopman, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 157-173.
- Richardson, D.W. and Dodge, G.R. (1997) Cloning of equine type II procollagen and the modulation of its expression in cultured equine articular chondrocytes. *Matrix Biol* **16**, 59-64.
- Riggs, C.M. (2006) Osteochondral injury and joint disease in the athletic horse. *Equine Veterinary Education* **18**, 128-144.
- Robinson, D.R. (1997) Eicosanoids and related compounds. In: *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*, 13 edn., Ed: W.J. Koopman, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 515-528.
- Rodkey, W.G. and McKinney, L.A. (1993) Review of structure, function and composition of cartilage and synovium. In: *Disease mechanisms in small animal surgery*, Ed: M.J. Bojrab, Lea & Febiger, Philadelphia. pp 649-655.
- Rossdale, P.D., Hopes, R., Digby, N.J. and offord, K. (1985) Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec* **116**, 66-69.

- Rühimäki, H. and Vükari-Juntura, E. (2000) Le système musculo-squelettique. In: *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail*, 4 edn., Ed: J.M. Stellman, ILO, Genève. pp 6.1-6.20.
- Sandell, L.J. and Hering, T.M. (2001) Biochemistry and molecular and cell biology of articular cartilage in osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management*, 3 edn., Eds: R.W. Moskowitz, D.S. Howell, R.D. Altman, J.A. Buckwalter and V.M. Goldberg, W.B.Saunders Company, Philadelphia. pp 115-143.
- Savouret, J.F. and Corvol, M. (2006) Signalisation cellulaire et pharmacologie du cartilage. In: http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/umr747/presentation_equipe2_fr.html.
- Shibakawa, A., Yudoh, K., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K. and Nakamura, H. (2005) The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 679-687.
- Simmons, E.J., Bertone, A.L. and Weisbrode, S.E. (1999) Instability-induced osteoarthritis in the metacarpophalangeal joint of horses. *Am J Vet Res* **60**, 7-13.
- Sires, U.I., Schmid, T.M., Fliszar, C.J., Wang, Z.Q., Gluck, S.L. and Welgus, H.G. (1995) Complete degradation of type X collagen requires the combined action of interstitial collagenase and osteoclast-derived cathepsin-B. *J Clin Invest* **95**, 2089-2095.
- Sledge, C.B. (1994) Biology of the joint. In: *Arthritis and Surgery*, Eds: C.B. Sledge, S. Rudoly, E.D. Harris and W.N. Kelley, W.B.Saunders Company, Philadelphia. pp 1-21.
- Smith, K.J., Bertone, A.L., Weisbrode, S.E. and Radmacher, M. (2006) Gross, histologic, and gene expression characteristics of osteoarthritic articular cartilage of the metacarpal condyle of horses. *Am J Vet Res* **67**, 1299-1306.
- Soderstrom, M., Salminen, H., Glumoff, V., Kirschke, H., Aro, H. and Vuorio, E. (1999) Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim Biophys Acta* **1446**, 35-46.
- Sondergaard, B.C., Henriksen, K., Wulf, H., Oestergaard, S., Schurigt, U., Brauer, R., Danielsen, I., Christiansen, C., Qvist, P. and Karsdal, M.A. (2006) Relative contribution of matrix metalloprotease and cysteine protease activities to cytokine-stimulated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 738-748.
- Squires, G.R., Okouneff, S., Ionescu, M. and Poole, A.R. (2003) The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 1261-1270.
- Todhunter, R. (1996) Anatomy and physiology of synovial joints. In: *Joint disease in the horse*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders, Philadelphia. pp 1-28.
- Trumble, T.N., Trotter, G.W., Oxford, J.R., McIlwraith, C.W., Cammarata, S., Goodnight, J.L., Billingham, R.C. and Frisbie, D.D. (2001) Synovial fluid gelatinase concentrations and

- matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am J Vet Res* **62**, 1467-1477.
- Tung, J.T., Arnold, C.E., Alexander, L.H., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Venta, P.J., Richardson, D.W. and Caron, J.P. (2002) Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *Am J Vet Res* **63**, 987-993.
- van der Harst, M., Bull, S., Brama, P.A., Barneveld, A.B., van Weeren, P.R. and van de Lest, C. (2006) Nitrite and nitrotyrosine concentrations in articular cartilage, subchondral bone, and trabecular bone of normal juvenile, normal adult, and osteoarthritic adult equine metacarpophalangeal joints. *J Rheumatol* **33**, 1662-1667.
- Weisbröde, S., E. and Doige, C., E. (2001) Bone and joints. In: *Thomson's special veterinary pathology*, 3 edn., Eds: M. McGavin, D., W. Carlton, W. and J. Zachary, F., Mosby, St Louis. pp 499-536.
- Werb, Z. and Alexander, C.M. (1994) Proteinases and matrix degradation. In: *Arthritis and Surgery*, Eds: C.B. Sledge, S. Rudoly, E.D. Harris and W.N. Kelley, W.B.Saunders Company, Philadelphia. pp 102-122.
- Wu, L.D., Yu, H.C., Xiong, Y. and Feng, J. (2006) Effect of dehydroepiandrosterone on cartilage and synovium of knee joints with osteoarthritis in rabbits. *Rheumatol Int* **27**, 79-85.
- Wu, W., Billingham, R.C., Pidoux, I., Antoniou, J., Zukor, D., Tanzer, M. and Poole, A.R. (2002) Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis Rheum* **46**, 2087-2094.
- Yamashita, D.S. and Dodds, R.A. (2000) Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K. *Curr Pharm Des* **6**, 1-24.
- Yasuda, Y., Kaleta, J. and Bromme, D. (2005) The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 973-993.
- Young, A.B., O'Brien, T.R. and Pool, R.R. (1988) Exercise-related sclerosis in the third carpal bone of the racing thoroughbred. In: *American Association of equine practitioners*. pp 339-346.
- Young, D.R., Richardson, D.W., Markel, M.D. and Nunamaker, D.M. (1991) Mechanical and morphometric analysis of the third carpal bone of Thoroughbreds. *Am J Vet Res* **52**, 402-409.