

Université de Montréal

**Étude du cross-talk entre la voie de synthèse des prostaglandines et des
leucotriènes dans les membranes synoviales arthrosiques humaines**

par

Patrick Marcouiller

Département des Sciences Biomédicales, Université de Montréal

Faculté de Médecine

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

Avril 2004

© Patrick Marcouiller, 2004



W

4

U58

2004

V.065

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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.

Sommaire

L'arthrose est caractérisée par une dégradation du cartilage, une sclérose de l'os sous-chondral et inflammation de la membrane synoviale. Cette membrane produit des médiateurs pro-nflammatoires (IL-1 β et TNF α). Ces cytokines accentuent les lésions cartilagineuses et stimulent la production de différents médiateurs lipidiques (prostaglandines et leucotriènes) synthétisés respectivement par les cyclooxygénases (COX) et la 5-lipoxygénase (5-LO). Il a été suggéré que l'inhibition des COXs par les AINS (anti-inflammatoire non-stéroïdien) provoque un « shunt » vers la voie de la 5-LO, responsable des effets secondaires des AINS.

Le but de notre travail était d'étudier les mécanismes biologiques et moléculaires impliqués dans la production des PGE₂ et du LTB₄ au sein de la membrane synoviale et de confirmer le phénomène du « shunt » dans cette dernière.

Nous avons étudié le mécanisme régulant la synthèse des PGE₂ et du LTB₄ en utilisant le naproxen (inhibiteur non-sélectif des COX), la Licofelone (inhibiteur mixte des COX et de la 5-LO) et le NDGA, un inhibiteur des lipoxygénases (LO).

Le naproxen cause une augmentation de la synthèse de LTB₄ comparativement au contrôle, démontrant le « shunt » de la voie des COXs vers la 5-LO. Ce phénomène peut être partiellement renversé par l'ajout de PGE₂ exogène. En stimulant avec le LPS, la Licofelone et le NDGA diminuent la synthèse de LTB₄.

Dans des conditions basales, la Licofelone (et non le naproxen) diminue la synthèse de LXA₄, une molécule avec des effets anti-inflammatoires. Aussi, le ratio LTB₄/LXA₄ est augmenté avec le naproxen (favorisant l'inflammation), mais pas avec la Licofelone.

Lors de notre étude nous avons démontré la présence d'un shunt entre la voie des COX vers celle de la 5-LO. Nous avons également démontré que les PGE₂ régulent la synthèse du LTB₄ et que le ratio LTB₄/LXA₄ est augmenté par le naproxen, mais non par la Licofelone. Par conséquent, en inhibant les COX et la 5-LO, la Licofelone peut favoriser la résolution de l'inflammation dans l'arthrose.

Mots clés :

- Arthrose
- Licofelone
- Cyclooxygénase
- 5-lipoxygénase
- AINS
- Prostaglandines
- Leucotriènes
- « Shunt »
- PGE₂
- LTB₄

Summary

Osteoarthritis is characterized by a degradation of the cartilage, a sclerosis of the subchondral bone and an inflammation of the synovium. The synovium produces pro-inflammatory mediators (IL-1 β and TNF α). These cytokines increase the lesions on the cartilage and stimulate the synthesis of different lipid mediators (prostaglandins and leukotrienes) produced respectively by the cyclooxygenases (COX) and the 5-lipoxygenase (5-LO). It has been suggested that the inhibition of COX by NSAIDs (non-steroid anti-inflammatory drug) may lead to a shunt toward the 5-LO pathway, which could be responsible for the side effects of NSAIDs.

The aim of our work was to study the biological and molecular mechanisms implicated in the production of PGE₂ and LTB₄ in the synovium and to confirm the shunt in this tissue.

Therefore, we investigated the mechanisms of regulation of PGE₂ and LTB₄ synthesis with different naproxens (non-selective inhibitor of the COXs); Licofelone (dual inhibitor of the COXs and the 5-LO) and the NDGA, an inhibitor of the lipoxygenases (LO).

In the presence of naproxen there is an increase in production of LTB₄ compared with the control demonstrating a shunt from the COX to the 5-LO pathway. This shunt can be partially reversed by the addition of exogenous PGE₂. Under

stimulation with LPS, Licofelone and NDGA reduce the production of LTB₄. In basal conditions, Licofelone inhibited LXA₄ production (which has anti-inflammatory properties). Under the same conditions naproxen failed to inhibit LXA₄ production. In addition, the ratio of LTB₄/LXA₄ with naproxen was increased (favouring the inflammatory process), while this was not observed in Licofelone.

Our studies have demonstrated the shunt from the COX pathway toward the 5-LO pathway. We have also demonstrated that the PGE₂ can regulate the synthesis of the LTB₄ and that the LTB₄/LXA₄ ratio is increased by the naproxen while Licofelone didn't. Thus, inhibiting the COXs and the 5-LO pathway, the Licofelone can favor the inflammation in osteoarthritis.

Mots clés :

- Osteoarthritis	- Prostaglandins
- Licofelone	- Leukotrienes
- Cyclooxygenase	- Shunt
- 5-lipoxygenase	- PGE ₂
- NSAIDs	- LTB ₄

Table des Matières

LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
DÉDICACE	xiv
INTRODUCTION	1
1. L'ARTHROSE	1
1.1. Pathophysiologie	2
1.1.1. Membrane synoviale	3
1.1.1.1. Structure	3
1.1.1.1.1. Couche intime	5
1.1.1.1.2. Couche sous-intime	6
1.1.1.1.3. Vascularisation	6
1.1.1.1.4. Réseau lymphatique	7
1.1.1.1.5. Innervation	7
1.1.1.2. Composition	7
1.1.1.2.1. Les cellules	8
1.1.1.2.1.1. Couche intime	8
1.1.1.2.1.1.1. Cellules de type B	8
1.1.1.2.1.1.2. Cellules de type A	9
1.1.1.2.1.1.3. Cellules de type C	10
1.1.1.2.1.2. Couche sous-intime	10
1.1.1.2.1.3. Autres cellules	10
1.1.1.2.2. La matrice extracellulaire	10
1.1.1.2.2.1. Couche intime	11
1.1.1.2.2.2. Couche sous-intime	12
1.1.1.3. Implication de la membrane synoviale dans l'arthrose	12

1.1.1.3.1.	La mise en place de l'inflammation de la membrane synoviale	13
1.1.1.3.2.	Les évidences de l'implication de la membrane synoviale dans la progression de l'arthrose	14
1.1.1.3.3.	Les facteurs inflammatoires, produits par la membrane synoviale, qui sont impliqués dans la genèse des changements dans l'arthrose	15
1.1.1.3.3.1.	TNF α	15
1.1.1.3.3.2.	MMP	15
1.1.1.3.3.3.	IL-1 β	16
1.1.1.3.3.4.	PGE $_2$ et LTB $_4$	16
1.1.2.	Cartilage	17
1.1.2.1.	Structure	17
1.1.2.2.	Composition	17
1.1.2.3.	Cartilage arthrosique	19
1.1.3.	Os sous-chondral	21
1.1.3.1.	La structure de l'os	21
1.1.3.2.	Les cellules	22
1.1.3.3.	Composition de l'os	22
1.1.3.4.	L'os sous-chondral et l'arthrose	22
2.	LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE	23
2.1.	La phospholipase A2	23
2.2.	Les cyclooxygénases	24
2.2.1.	Structure	25
2.2.2.	Localisation	26
2.2.3.	Fonctions	28
2.2.4.	Activité enzymatique	30
2.2.5.	La COX-3	32
2.3.	Les lipoxygénases	32

2.3.1. La 5-lipoxygénase	34
2.3.2. Les 12-lipoxygénase et 15-lipoxygénase	36
3. LES ANTI-INFLAMMATOIRES	37
3.1. Les AINS	37
3.1.1. mode d'action	37
3.2. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2	38
3.3. La Licofelone	40
3.4. Le NDGA	42
MÉTHODOLOGIE	44
RÉSULTATS	46
LEUKOTRIENE AND PROSTAGLANDIN SYNTHESIS PATHWAYS IN OSTEOARTHRITIC SYNOVIAL MEMBRANES: REGULATING FACTORS FOR IL-1β SYNTHESIS	48
Abstract	49
Introduction	50
Materials and methods	51
Results	55
Discussion	57
Acknowledgements	62
References	63
Figures	69
DISCUSSION	77
AINS et métabolisme des PGE ₂	77
Métabolisme du LTB ₄ et shunt	77
Réversibilité du shunt	78
Le shunt et sa régulation dans des conditions stimulées	80
Inhibition totale des COXs pour avoir le shunt	82

Le shunt de la 5-LO vers les COXs	83
Les inhibiteurs et la LXA ₄	84
Effet du LTB ₄ sur IL-1 β	86
CONCLUSION	88
BIBLIOGRAPHIE	90
DÉCLARATION DE L'ÉTUDIANT	117

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des COX-1 et -225
Tableau 2 : Localisation des COX-1 et -2 au niveau tissulaire.28
Tableau 3 : Fonctions physiologiques des deux isoformes de la COX30
Tableau 4 : Caractéristiques de la COX-3 comparées avec celles des COX-1 et -2.	32
Tableau 5 : Caractéristiques générales des LOs.33
Tableau 6 : Rôles majeurs des leucotriènes.34

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la membrane synoviale.	5
Figure 2 : Fonctions des prostaglandines.	29
Figure 3 : Métabolisme de l'AA par la cyclooxygénase.	31
Figure 4 : Métabolisme de l'AA par la 5-LO.	35
Figure 5 : Voies métaboliques des lipoxygénases.	36
Figure 6 : Inhibition des voies métaboliques de l'AA par les différentes classes d'inhibiteurs.	42
Figure 7 : Résultats complémentaires : effet de la Licofelone sur l'expression de la COX-2	46
Figure 8 : Résultats complémentaires : quantification de l'expression de la COX-2 sous l'effet de la Licofelone.	46

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
ASA	Acide acétylsalicylique
ATP	Adénosine triphosphate
COMP	Protéine oligomérique du cartilage
COX	Cyclooxygénase
CRP	Protéine C-réactive
FLAP	Protéine activatrice de la 5-lipoxygénase
IGF-1	Facteur de croissance insulino-mimétique 1
IL	Interleukine
LO	Lipoxygénase
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leucotriène
LTB ₄	Leucotriène B ₄
LXA ₄	Lipoxine A ₄
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéases matricielles
MS	Membrane synoviale
NDGA	Acide Nordihydroguaiarétique
PCR	Réaction en chaîne par la polymérase
PG	Prostaglandine
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGG ₂	Prostaglandine G ₂
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGHS	Prostaglandine endoperoxyde H synthase
PGI ₂	Prostaglandine I ₂ (ou prostacycline)
PLA ₂	Phospholipase A ₂

PMN	Cellules polymorphonucléaires
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor system
RE	Réticulum endoplasmique
TGF β	Facteur de croissance transformant β
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TNF α	Facteur nécrosant des tumeurs α
TX	Thromboxane
TXA ₂	Thromboxane A ₂

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier le Dr Pascal Reboul pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Comme première expérience réelle avec un étudiant gradué, je crois qu'il s'en est sorti de façon remarquable. Il a su bien me diriger dans mon travail pendant ces deux dernières années. Il m'a également permis de développer mon côté critique face à la science. Un séjour avec le Dr Reboul permet également de forger le caractère et je lui en suis reconnaissant pour ça.

Je remercie également Mélanie qui m'a montré de façon efficace la presque totalité des techniques que je maîtrise maintenant parfaitement. Merci à François « Le Dieu » Mineau (car il sait tout faire dans un labo et si personne ne connaît la réponse, lui il la connaît) pour ces nombreux conseils dans les moments creux de ma maîtrise. Merci également à François-Cyril Jolicoeur pour son amitié et pour les nombreux dosages qu'il a fait pour moi. Je remercie également Aline pour ses conseils et surtout pour sa personnalité colorée.

Je remercie également tout le personnel de l'unité de recherche en arthrose pour leur aide. C'est une équipe formidable qui sait ce que le mot entraide signifie. Il serait injuste d'oublier France, Santa, Heather et Lorraine qui sont nos secrétaires si dévouées. Merci pour votre aide précieuse, surtout dans la rédaction de mes textes en anglais.

Merci à Fred et Christelle pour leurs judicieux conseils dans mes présentations et dans la rédaction de mon mémoire.

Je remercie l'Université de Montréal et l'Institut universitaire de gériatrie de Montréal (Bourse Marthe-Demers) pour leur appui financier durant ce projet.

Finalement, un gros merci au Dre Johanne Martel-Pelletier et au Dr Jean-Pierre Pelletier, directeurs de l'unité de recherche en arthrose, qui m'ont permis de travailler sur un projet de recherche aussi captivant. Ce sont des personnes respectées et respectables avec une forte personnalité avec lesquelles j'ai eu autant de plaisir à travailler qu'à socialiser.

À Méman et Ti-Père

À mon amour Julie « Laa – Laa » Pepin

À Alain et Marie-Claude

À ma chère grand-mère Hélène Noël

À ma belle-maman « Cheulée »

*À tous ceux et celles qui ont su me supporter pendant ces
deux années*

À la douce mémoire de mes grands-parents

Gracia et Arthur Milot et Oscar Noël

INTRODUCTION

1. L'ARTHROSE

L'arthrose est l'arthropathie la plus courante qui touche les articulations (Yuan et *al.*, 2004; Satku, 2003; Simon, 1999b; Sharma, 2003; Espallargues et Pons Joan, 2003). C'est une maladie débilitante qui peut toucher toutes les articulations synoviales et plus particulièrement celles des membres inférieurs : les articulations des genoux et des hanches (Mollenhauer et Erdmann, 2002; Shieh et Athanasiou, 2002; Simonet, 2002). Il s'agit également d'une pathologie sournoise car elle progresse lentement et souvent de façon asymptomatique. En effet, son évolution peut s'étendre de quelques années à 20 ou 30 ans (Cole et Kuettner, 2002; Lohmander, 2000; Bailey et Mansell, 1997; Chevalier, 2000; Poole et *al.*, 2002; Muldrew, 2002; Espallargues et Pons Joan, 2003). Évidemment, quand les patients atteints d'arthrose en ressentent les premiers effets (ex : la douleur), la maladie est déjà dans un stade avancé (Hinton et *al.*, 2002). Cette douleur se manifeste généralement lors d'une activité physique quelconque. Par contre, pour certaines personnes chez qui la pathologie est très avancée, la douleur persiste même au repos. La douleur et la dysfonction articulaire résultant de l'arthrose font en sorte qu'il y a une diminution de la qualité de vie des patients. Ceci contribue à ce que ceux-ci aillent consulter puisque leurs activités quotidiennes en sont affectées et qu'ils ne peuvent plus se déplacer avec autant d'aisance. Ces patients se considèrent, d'une certaine manière, comme infirmes (Hedbom et Häuselmann, 2002; Felson et *al.*, 2000; Jordan, 1999; Hurley, 2003; Teichtahl et *al.*, 2003; Buckwalter et Mankin, 1998; Espallargues et Pons Joan, 2003; Martin et Buckwalter, 2001). De plus, le traitement de l'arthrose se fait cas par cas parce que cette pathologie évolue de façon différente d'un individu à l'autre (Lohmander, 2000).

1.1. PATHOPHYSIOLOGIE

L'arthrose résulte d'évènements mécaniques et biologiques qui provoquent un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire (par les chondrocytes), et de l'os sous-chondral (Cole et Kuettner, 2002; Chevalier, 1998). Tout au long de la maladie, nous assistons à une dégradation du cartilage articulaire (ou cartilage hyalin), entraînant le développement de fibrillations, de fissures et d'ulcérations. Cette dégénérescence fait en sorte qu'il y a amincissement du cartilage qui se poursuit jusqu'à la perte totale de ce dernier (Bailey et Mansell, 1997; Setton et *al.*, 1999; Jouzeau et *al.*, 2000; Guincamp et *al.*, 2000; van der Kraan et van den Berg, 2000; Martin et Buckwalter, 2002; Fransen et *al.*, 2002; Kerin et *al.*, 2002). Avec la perte du cartilage articulaire, il y a également la perte de la fonction mécanique de ce dernier, qui consiste à assurer le mouvement rapide de l'articulation sans friction (ou très peu) et sans douleur (Lohmander, 2000; Setton et *al.*, 1999; Buckwalter et Martin, 1996; McCarty et Koopman, 1993). Ces évènements font en sorte que tout mouvement de l'articulation atteinte devient pénible lors de diverses activités sous l'effet de la douleur. Ceci fait de l'arthrose une maladie incapacitante (Tsai et Tak, 2003).

Malgré le fait que l'arthrose soit caractérisée surtout par la dégradation du cartilage, il n'en demeure pas moins que ce n'est pas le seul tissu touché. En effet, cette pathologie touche un ensemble de tissus qui composent un organe qu'est l'articulation (Sandell et Aigner, 2001; Hedbom et Häuselmann, 2002; Mollenhauer et Erdmann, 2002; Bailey et Mansell, 1997; Bjelle, 1994). Donc, parallèlement à la dégénérescence cartilagineuse, il y a également un remodelage de l'os sous-chondral. En effet, il y a une sclérose (épaississement) de l'os se trouvant juste sous le cartilage. La densité de cette structure étant augmentée, il y aurait une accentuation des lésions au niveau du cartilage. De plus, il y a également formation d'excroissances osseuses (ou ostéophytes) sur les pourtours de l'articulation (Lohmander, 2000; Bailey et Mansell, 1997; Chevalier, 1998; Poole, 1997). Au stade clinique de la pathologie, il y

a aussi une inflammation de la membrane synoviale (MS), phénomène qui est secondaire à l'arthrose (Guincamp et *al.*, 2000). En effet, contrairement à l'arthrite rhumatoïde, l'arthrose n'est pas une maladie inflammatoire (Hedbom et Häuselmann, 2002; Goggs et *al.*, 2003). L'inflammation est une conséquence de la pathologie. Néanmoins, elle ne constitue pas seulement un symptôme de la maladie. Il a été démontré que l'inflammation de la MS accentue les lésions au niveau du cartilage. Elle est donc essentielle à la progression de l'arthrose (Hedbom et Häuselmann, 2002). Évidemment, quand il y a inflammation, il y a : douleur, sensation de chaleur au niveau de l'articulation atteinte, raideur, épanchement et enflure (Mollenhauer et Erdmann, 2002; Chevalier, 1998). C'est pour ces raisons que les patients consultent. Il se peut également que l'inflammation puisse s'étendre aux tissus articulaires périphériques (Hinton et *al.*, 2002).

Bien qu'ils ne soient pas réellement impliqués dans l'arthrose, les tissus articulaires périphériques (ligaments, capsule articulaire, muscles et nerfs) peuvent toutefois s'affaiblir faisant en sorte que l'articulation devienne instable (Bailey et Mansell, 1997; Hedbom et Häuselmann, 2002). En effet, une déchirure du ligament ou du ménisque pourrait initier l'arthrose, et les événements subséquents s'enchaîneraient jusqu'à la destruction totale du cartilage (Setton et *al.*, 1999). Puisque la MS est essentielle dans la progression de la pathologie et dans la destruction du cartilage, il est important de détailler sa structure, sa composition et sa physiologie.

1.1.1. LA MEMBRANE SYNOVIALE

1.1.1.1. STRUCTURE

La MS est un tissu bien vascularisé et bien innervé qui possède trois fonctions importantes (Mapp et *al.*, 1990; Resnick et Niwayama, 1988). Dans un premier temps, elle produit le liquide lubrifiant (fluide synovial) qui permet aux surfaces

articulaires de bien glisser l'une sur l'autre. Ceci est permis grâce à la continuité (ou tissage serré) de la membrane. Ceci assure la rétention du liquide synovial dans la cavité articulaire (Edwards, 1994). La membrane permet également de retirer les débris cellulaires et les particules de l'espace articulaire. Finalement, elle permet de réparer les dommages causés à l'articulation. Ceci implique une production de collagène et un remodelage qui sont effectués essentiellement par les synoviocytes de type B (Fox et Kang, 1993).

La membrane est caractérisée par une matrice extracellulaire (MEC) qui, en apparence, semble bien organisée et dans laquelle se trouvent les cellules synoviales (Simkin, 1994). Ces cellules ne sont pas reliées par des jonctions intercellulaires serrées (Henderson et Pettipher, 1985), bien qu'elles aient des prolongements de membrane cytoplasmique qui, en se rejoignant, forment un réseau complexe. Également, il n'est pas rare que ces cellules soient séparées par un espace de 1 à 2 mm (Dupuis et Leclaire, 1986; Simkin, 1994; Garnero et *al.*, 2000). Donc, malgré le fait que la MS forme une couche compacte, elle n'est pas continue (Dijkgraaf et *al.*, 1996). La MS recouvre toute l'articulation à l'intérieur de la capsule fibreuse, à l'exception du cartilage hyalin et des ménisques (Simkin, 1994). Cependant, lors du mouvement de l'articulation, elle peut temporairement recouvrir le cartilage qui n'est pas en contact avec le cartilage opposé (Simkin, 1993). Près de l'os, la membrane se sépare de la capsule et s'étale sur le périoste (Dupuis et Leclaire, 1986). Macroscopiquement, la MS semble être lisse et luisante. Cependant, elle possède des microvillosités qui permettent l'extension de la membrane durant le mouvement articulaire ou en réponse à un changement de pression intra-articulaire (Simkin, 1993; Fox et Kang, 1993). Cette caractéristique lui permet de bien suivre les différents mouvements de l'articulation (Simkin, 1993).

Il existe trois compartiments composant la membrane, soient : la couche intimale, la couche sous-intimale (ou couche stromale) et un réseau de vaisseaux sanguins microscopiques imbriqué dans les couches intimale et sous-intimale (figure

1) (Garnero et *al.*, 2000). Bien qu'ils s'agissent de compartiments distincts, ceux-ci ne sont pas séparés physiquement par une membrane basale (Fox et Kang, 1993; Garnero et *al.*, 2000; Iwanaga et *al.*, 2000). Cependant, il existe un genre de barrière chimique qui limite la diffusion des facteurs de régulation entre les différents compartiments (Walsh et *al.*, 1993). Cette caractéristique et l'absence de jonction intercellulaire font en sorte que le terme « membrane » est un peu inapproprié pour ce tissu. Ce terme fait plutôt référence à l'épithélium qui possède des jonctions intercellulaires serrées et une membrane basale (Sledge et *al.*, 2001).

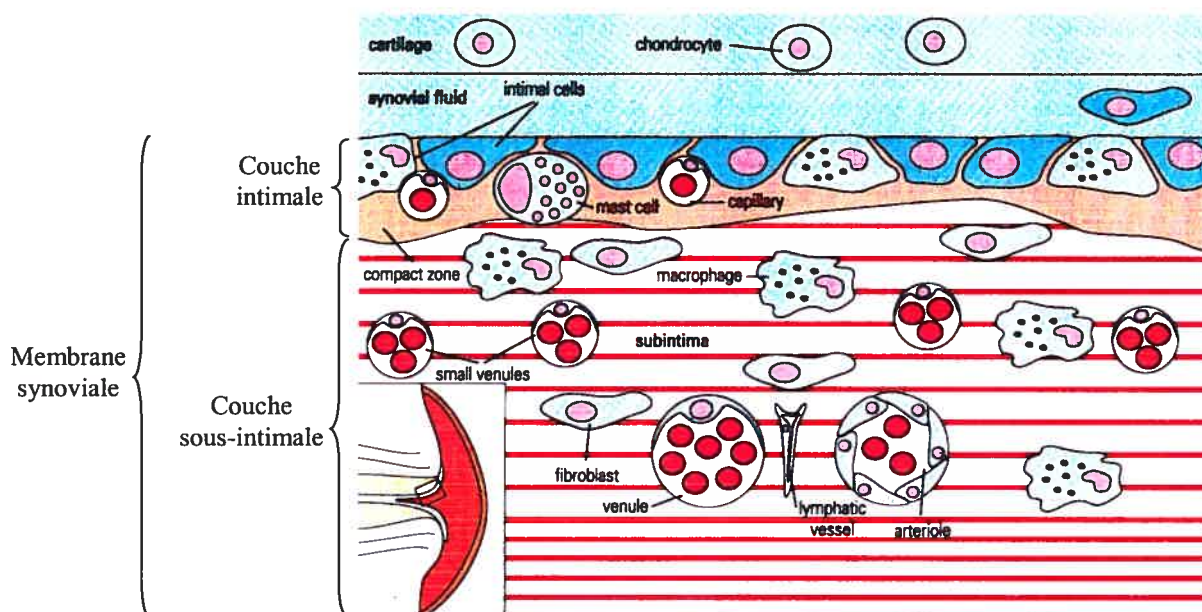


Figure 1 : Représentation schématique de la membrane synoviale. (modifié de Simkin, 1994)

La couche intimale est constituée de cellules synoviales éparpillées dans la matrice extracellulaire lâche et n'est pas plus épaisse qu'une feuille de papier (Sledge et *al.*, 2001; Simkin, 1994). Elle se retrouve entre la cavité articulaire et la couche sous-intimale. La couche intimale possède une épaisseur d'environ 3 à 4 rangées de cellules (soit environ 20 à 50 μm d'épaisseur) (Garnero et *al.*, 2000; Edwards, 1994; Pasquali-Ronchetti et *al.*, 1992). Ces cellules ont une forme plutôt aplatie et allongée (Barland et *al.*, 1962). Cependant, il peut arriver qu'il n'y ait qu'une seule couche de cellules, ou encore, que seule la MEC recouvre les tissus sous-jacents. C'est ce qu'il

est possible de voir au niveau des tendons et des ligaments (Bassleer et *al.*, 1982). La couche intimale, et plus particulièrement sa MEC, pourrait avoir comme fonction la régulation de l'homéostasie hydrique et le transport des protéines plasmatiques dans le liquide synovial (Culty et *al.*, 1992). Cette couche est bien lubrifiée afin de glisser librement sur les structures. Si ce n'était pas le cas, la MS pourrait se coincer entre les cartilages opposés. Il en résulterait alors une hémorragie, qui de façon répétée, pourrait provoquer un certain handicap (Simkin, 1993).

La couche sous-intimale (ou stromale) est celle qui est la plus profonde et qui fait face à la capsule articulaire. Il s'agit d'une couche de tissu mésenchymateux hétérogène d'épaisseur variable qui sépare la couche intimale de la capsule (Sledge et *al.*, 2001). Cette partie de la MS est constituée essentiellement de matrice extracellulaire. En effet, elle comporte beaucoup moins de cellules que la couche intimale (Dupuis et Leclaire, 1986). Aussi, la structure hétérogène de la couche sous-intimale peut varier dans une même articulation. Il est également possible que la couche sous-intimale soit tellement mince que nous puissions seulement distinguer la couche intimale (Resnick et Niwayama, 1988). Selon la composition de la couche sous-intimale, la MS peut être de trois types : aréolaire, fibreux ou adipeux.

La MS est un tissu richement vascularisé (Imhof et *al.*, 2002). La vascularisation varie selon le type de MS et selon l'âge (Ghadially, 1983). Ce réseau vasculaire joue trois rôles importants : premièrement il permet l'échange de soluté et de gaz nécessaires pour la MS elle-même et pour le cartilage avasculaire. Deuxièmement, cette vascularisation est essentielle pour la production du liquide synovial. Puis troisièmement, elle permet de réguler la température de l'articulation (Sledge et *al.*, 2001). Le réseau vasculaire de la MS est également caractérisé par des anastomoses entre les vaisseaux sanguins de la couche sous-intimale et la capsule articulaire, les tendons, les ligaments, le périoste et l'os adjacent (Hasselbacher, 1994). Dans la couche sous-intimale de la MS, les vaisseaux sanguins sont plus gros et ont une paroi plus épaisse qui répond à des facteurs locaux tel l'histamine, ce qui

permet la diapédèse des cellules. Dans la couche intimale superficielle, les vaisseaux sanguins sont microscopiques et ont une paroi beaucoup plus mince de type fenêtré (Allan et *al.*, 1998; Dupuis et Leclaire, 1986). Cette caractéristique favorise les échanges entre la MS et le sang. Cependant, ces capillaires et leurs veinules post-capillaires n'assurent pas que les échanges entre la MS et le sang. C'est à travers ceux-ci que les cellules immunitaires et les cellules médiatrices de l'inflammation arrivent (Hasselbacher, 1994).

La MS comporte également un système lymphatique (Wilkinson et Edwards, 1989; Rodnan et Schumacher, 1983; Stevens et *al.*, 1991; Davies et Edwards, 1948). Celui-ci permet de drainer l'excès de fluide, les protéines de haut poids moléculaire, les petites particules et quelques cellules. Ce réseau lymphatique se trouve plus profondément dans la couche sous-intimale et suit les artères et les veines (Garnero et *al.*, 2000; Hasselbacher, 1994).

La MS est innervée par des fibres sensorielles (innervation afférente). Celles-ci sont des fibres de type C qui sont minces et non-myélinisées. Ces fibres entourent les vaisseaux sanguins et peuvent s'étendre dans la couche superficielle de la membrane, soit la couche intimale. La MS possède aussi des fibres dites efférentes qui proviennent du système nerveux sympathique. Ce type de fibres suit également les vaisseaux sanguins, mais cette fois-ci, plus profondément dans la MS. Ainsi, le pincement de la MS donnerait lieu à une douleur. En effet, la MS est un tissu bien innervé (Mapp et *al.*, 1990).

1.1.1.2. COMPOSITION

La MS étant un tissu multicellulaire complexe, il est normal de faire la lumière sur la composition cellulaire et la structure de la MEC de cette dernière.

LES CELLULES

COUCHE INTIMALE

Dans un premier temps, la couche intimale de la membrane est constituée de cellules qui ne sont pas réparties uniformément. En effet, celles-ci peuvent être condensées en certains endroits alors qu'il n'y en a pratiquement pas en d'autres endroits (Resnick et Niwayama, 1988). Parmi ces cellules nous avons les synoviocytes de type A et de type B.

Les synoviocytes de type B, dérivés des fibroblastes spécialisés du mésenchyme (Imhof et *al.*, 2002; Buckwalter et Martin, 1996; Edwards et Willoughby, 1982), constituent environ 70-80% des cellules de la couche intimale. Celles-ci se trouvent un peu plus profondément que les cellules de type A (Graabaek, 1982; Okada et *al.*, 1981; Iwanaga et *al.*, 2000). Il arrive aussi que les cellules de type B se retrouvent dans la couche sous-intimale (Edwards, 2000). Ces cellules possèdent les caractéristiques des fibroblastes du tissu conjonctif (Fox et Kang, 1993). Elles ont de nombreuses vacuoles et une grande quantité de filopodes. Elles ont également un gros noyau, peu de cytoplasme, un appareil de Golgi bien développé et un réticulum endoplasmique rugueux très apparent (Resnick et Niwayama, 1988; Fox et Kang, 1993; Ghadially, 1983; Iwanaga et *al.*, 2000). Elles possèdent aussi des granules de sécrétion (Okada et *al.*, 1981a). Ces structures sont caractéristiques d'une cellule ayant une capacité synthétique importante. Une autre chose intéressante à propos de ces cellules est la présence de prolongements cytoplasmiques. Ces prolongements varient en forme et en longueur et se rendent jusqu'à la surface de la MS (du côté de la cavité articulaire). Ceci pourrait démontrer l'importance de ces cellules dans la production et la sécrétion de protéines et autres substances dans la cavité articulaire (Iwanaga et *al.*, 2000).

Les cellules de type B possèdent plusieurs fonctions. En effet, ce sont elles qui fournissent les nutriments au cartilage en produisant le liquide synovial. Elles assurent également la synthèse de la MEC de la MS et de plusieurs récepteurs d'adhésion à leur surface pour s'ancrer à la MEC (Aidinis et *al.*, 2003). En effet, les cellules de type B de la couche intime produisent et sécrètent, entre autre, de grandes quantités de hyaluronate qui est un constituant de la matrice interstitielle (Konttinen et *al.*, 2001; Edwards et Willoughby, 1982). Ce produit régule les interactions cellules-cellules et cellules-matrice, mais surtout joue un rôle essentiel dans la lubrification de l'articulation (Sledge et *al.*, 2001). Les synoviocytes de type B produisent également la lubricine qui, avec le hyaluronate, assure également la lubrification des articulations (Swann et *al.*, 1974).

Les synoviocytes de type A ressemblent à des macrophages. (Edwards et Willoughby, 1982). Ceux-ci constituent environ 20 à 30% des cellules de la couche intime et se trouvent à la surface de la MS (du côté luminal) (Graabaek, 1982; Okada et *al.*, 1981; Iwanaga et *al.*, 2000). Ces cellules sont dérivées de monocytes de la moelle osseuse (Imhof et *al.*, 2002; Buckwalter et Martin, 1996; Edwards et Willoughby, 1982). Un fait pouvant appuyer ceci est que ces cellules se retrouvent beaucoup autour des capillaires sanguins (Iwanaga et *al.*, 2000). Ce type de cellules a également été retrouvé dans le liquide synovial. En effet, celles-ci peuvent migrer dans la cavité articulaire (Curtiss, 1964). Les cellules de type A contiennent tout l'appareillage nécessaire pour la phagocytose, soient entre autre: beaucoup de lysosomes (Southwick et Bensch, 1971), des vacuoles, un appareil de Golgi bien développé, un réticulum endoplasmique rugueux plutôt rudimentaire (Shannon et Graham, 1971) et des filopodes qui entoureront les particules à phagocyter (Schumacher et *al.*, 1993; Henderson et Edwards, 1987; Ghadially, 1983).

Les cellules de type A seraient impliquées dans le retrait des particules et des débris cellulaires de la cavité articulaire en les phagocytant et en les dégradant (Allan et *al.*, 1998). Contrairement aux cellules de type B, celles de type A vont dégrader le

hyaluronate (Culty et *al.*, 1992). Le retrait des particules hors de l'articulation pourrait contribuer à la modification du contenu en protéines du liquide synovial par les cellules macrophagiques (type A) (Henderson et Edwards, 1987; Ghadially, 1983; Iwanaga et *al.*, 2000). Les substances qui ont été phagocytées sont par la suite acheminées vers les vaisseaux lymphatiques par les cellules de type A pour être éliminées de l'articulation de façon définitive (Itonaga et *al.*, 1997).

Il existerait également un troisième type de cellules synoviales (cellules de type C) dont la définition ne fait pas encore l'unanimité (Allan et *al.*, 1998; Graabaek, 1982, 1984).

COUCHE SOUS-INTIMALE

Dans la couche sous-intimale, nous retrouvons surtout des fibroblastes. Ces cellules se situent essentiellement juste sous la couche intimale et aux pourtours des vaisseaux sanguins. Elles ont des peptidases à leur surface qui contribuent à la compartimentalisation fonctionnelle des systèmes régulateurs de peptides dans le tissu (Mapp et *al.*, 1992). Cette couche contient également des macrophages et des mastocytes (Henderson et Edwards, 1987).

AUTRES CELLULES

Il y a également d'autres cellules présentes dans la MS. En effet, nous pouvons y retrouver des cellules avec une configuration dendritique, et parfois, quelques cellules blanches (cellules sanguines) (Schumacher et *al.*, 1993).

LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Parmi les constituants de la matrice nous retrouvons principalement le collagène sous forme de fibres libres, le hyaluronate qui a une grande importance

dans l'intégrité de la couche intimale (Pittsillides et *al.*, 1995) et la chondroïtine sulfate (Edwards, 1994), les deux derniers étant composés d'un protéoglycane combiné à un glycosaminoglycane qui existent également séparément dans la MEC. La matrice contient aussi d'autres molécules comme des protéoglycanes de faible poids moléculaire (Hasselbacher, 1994), des glycoprotéines (ex : fibronectine, en grande quantité) (Garnero et *al.*, 2000; Henderson et Edwards, 1987; Iwanaga et *al.*, 2000; Konttinen et *al.*, 2001), ainsi que des molécules d'adhésion telles la fibronectine et la sélectine (Fox et Kang, 1993).

COUCHE INTIMALE

La MEC de la MS se compose de nombreux constituants qui sont produits et sécrétés par les cellules de type B de la couche intimale. Cette couche est composée d'une matrice avec une ultrastructure amorphe (ou finement fibrillaire) (Ghadially, 1978). La MEC de la couche intimale contient moins de collagène que la couche sous-intimale (Ghadially, 1983; Henderson et Edwards, 1987). Parmi les types de collagène que nous y retrouvons, notons le collagène de type III qui est plus abondant que celui de type I (Ashhurst et *al.*, 1991; Okada et *al.*, 1990). Le collagène de type III joue un rôle, avec la fibronectine, dans l'adhésion des cellules et la signalisation cellulaire. Il est également important dans la structure et la fonction du tissu conjonctif. Le collagène de type VI est également abondant dans la couche intimale. Ce dernier se lie au hyaluronate et à la fibronectine et serait important dans le maintien de l'intégrité structurale de la MS (Garnero et *al.*, 2000). Nous retrouvons également du collagène de type IV dans la MS bien qu'il soit plus courant d'en voir dans la membrane basale (Jüsten et *al.*, 2000; Kottinen et *al.*, 2001). Un autre fait intéressant sur la composition de la MEC de la couche intimale, est la présence de chondroïtine-6-sulfate (CS6) du côté luminal de cette couche. En effet, comme pour le collagène de type IV, cette molécule se retrouve habituellement dans la membrane basale que nous ne retrouvons pas dans la couche intimale ou la MS. Les

synoviocytes ont également la capacité de synthétiser du collagène de type V que nous avons dans la couche intinale (Edwards, 1994).

COUCHE SOUS-INTIMALE

La couche sous-intimale de la MS diffère de la couche intinale dans sa composition en collagène. En effet, la couche sous-intimale est plus riche en collagène (Ghadially, 1983; Henderson et Edwards, 1987). Elle contient surtout du collagène de type I et III (Garnero et *al.*, 2000). Nous retrouvons également du collagène de type VI dans la couche sous-intimale (Konttinen et *al.*, 2001). Cette couche contient également d'autres composantes, comme le hyaluronate, qui sont présentes en moins grande quantité (Edwards, 1994). Le fait que l'on retrouve le hyaluronate jusqu'à un endroit aussi profond de la couche sous-intimale nous indique un mouvement possible de ce dernier vers les vaisseaux lymphatiques (Henderson et Edwards, 1987). Nous retrouvons aussi la chondroïtine-4-sulfate (CS4) dans cette couche (Edwards, 1994). Évidemment, la couche sous-intimale contient aussi des glycoprotéines structurales (ex : fibronectine, laminine, l'entactine et la tenascine), des protéoglycanes ainsi que des glycosaminoglycanes. (Garnero et *al.*, 2000).

1.1.1.3. IMPLICATION DE LA MS DANS L'ARTHROSE

Le rôle de la MS dans la progression de l'arthrose, et plus particulièrement la dégradation du cartilage, a été négligé par plusieurs (Oehler et *al.*, 2002).

Pour parler de l'implication de la MS il est important de reprendre deux questions qui ont été posées par Pelletier et *al.* (2001a), soient : Quelles évidences avons-nous que l'inflammation est associée avec la progression de la pathologie? Et quels sont les facteurs inflammatoires produits par la MS qui seraient impliqués dans la genèse des changements dans l'arthrose? En premier lieu, il serait approprié de

nous poser la question suivante: comment se fait la mise en place de l'inflammation de la MS au cours de l'arthrose?

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'inflammation de la MS (ou synovite) est secondaire dans le développement de l'arthrose. En effet, ce phénomène est relié à la dégradation du cartilage articulaire et au relâchement de macromolécules de celui-ci dans le liquide synovial, soient essentiellement des fragments de collagène de type II et de protéoglycanes (Pelletier et *al.*, 2001a; Fassbender, 1994; Hamerman et Klagsbrunn, 1985).

Dans un premier temps, les débris cartilagineux, qui sont en quantité supérieure comparativement à des conditions physiologiques, vont provoquer une hyperplasie de la MS. En effet, les cellules macrophagiques de la MS phagocytent les débris présents dans le liquide synovial en temps normal. Puisque le nombre de ces particules augmente avec la dégradation du cartilage, il est normal d'assister à une activation et à une prolifération de ces cellules afin d'assurer la clairance de ces particules (Gardner, 1983; Fassbender, 1994; Hamerman et Klagsbrunn, 1985; Allan et *al.*, 1998).

Suite à la phagocytose des débris par les cellules de type A, nous avons l'inflammation de la MS proprement dit (Lohmander, 2000; Huskisson et *al.*, 1979). En effet, les débris cartilagineux ont des propriétés immunogéniques (Pelletier et *al.*, 2001a) et la membrane synoviale réagit à n'importe quel agent avec un mécanisme de défense général (Imhof et *al.*, 2002). Donc, après que les cellules soient entrées en contact avec les débris du cartilage, elles synthétisent différents produits de l'inflammation. Parmi ces produits nous comptons, entre autre, les cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules de type A (Pelletier et Martel-Pelletier, 1993) et de type B (McCarty et Koopman, 1993), des médiateurs lipidiques ainsi que des enzymes protéolytiques (MMP) produites par les cellules de type B (Allan et *al.*, 1998). Ces produits vont entraîner la dégradation de la matrice cartilagineuse de

même que celle de la MS elle-même. De cette manière, nous pouvons dire que les cellules synoviales ont un rôle pro-inflammatoire (Pelletier et *al.*, 1993; Farahat et *al.*, 1993). L'inflammation s'accompagne d'une infiltration de cellules (lymphocytes, macrophages, mastocytes, cellules sanguines et des neutrophiles) qui est toutefois moins importante que dans l'arthrite rhumatoïde (Pelletier et *al.*, 2001b; Oehler et *al.*, 2002; He et *al.*, 2002). Ces cellules infiltrantes vont également sécréter des cytokines pro-inflammatoires de même que des enzymes de dégradation.

Les enzymes protéolytiques faisant leur œuvre, il y aura une quantité encore plus importante de fragments présents dans le liquide synovial. Par le fait même, nous aurons une inflammation de la MS plus prononcée et une quantité plus grande de produits de l'inflammation seront synthétisés. Nous obtenons donc un cercle vicieux qui se perpétue jusqu'à la destruction totale du cartilage.

Comme il a été mentionné un peu plus haut, il arrive que la MS se prolonge un peu sur la surface articulaire. Il s'agit du pannus. Cette excroissance de la MS jouerait également un rôle dans le processus de dégradation du cartilage lorsque la MS est inflammée (Fassbender, 1975).

Il ne fait aucun doute que l'inflammation de la MS a un effet important dans le déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice cartilagineuse (Pelletier et *al.*, 2001b; Myers et *al.*, 1992). Cependant, quelles sont les évidences de l'implication de la MS dans la progression de l'arthrose? Principalement trois marqueurs sont associés avec l'inflammation de la MS : la protéine oligomérique du cartilage (COMP), la protéine C-réactive (CRP) et le hyaluronate (Kumon et *al.*, 1999; Belcher et *al.*, 1997; Praest et *al.*, 1997).

La COMP est une composante de la matrice cartilagineuse. Ainsi, un niveau de COMP plus élevé que la normale indique la présence d'une inflammation de la MS (Clark et *al.*, 1999; Petersson et *al.*, 1998; Lohmander et *al.*, 1994). Nous observons

la même chose avec la CRP et le hyaluronate. En effet, une élévation de la concentration de ces deux produits est signe d'une inflammation (Spector et *al.*, 1997; Goldberg et *al.*, 1991).

Comme il a été dit précédemment, la MS inflammée produira différents facteurs inflammatoires qui auront un impact sur la membrane elle-même, le cartilage et l'os sous-chondral. La première catégorie de facteurs manifestant leurs effets est celle des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 β et le TNF α , de même que l'IL-6 et l'IL-17, sécrétées par les synoviocytes activés, ainsi que par les cellules infiltrantes (monocytes et macrophages) (Müller-Ladner, 1996). Ces cytokines sont également les premiers produits de la MS inflammée à diffuser dans le liquide synovial. La grande production de cytokines et de facteurs de croissance par la MS joue un rôle important dans la pathogenèse de l'arthrose. En effet, ces produits sont impliqués dans la dégradation de la MS, du cartilage et de l'os sous-chondral (Pelletier et *al.*, 2001a).

Le TNF α a été décrit comme un modulateur dans le processus catabolique de l'arthrose. En effet, c'est lui qui soutient le processus inflammatoire (Caron et *al.*, 1996; Van de Loo et *al.*, 1995; Plows et *al.*, 1995). Il est également impliqué dans la dégradation du cartilage et dans l'inflammation de la MS (Pelletier et *al.*, 2001b). Aussi, il va induire la résorption osseuse et est donc impliqué dans le remodelage de l'os sous-chondral (Bertolini et *al.*, 1986). Le TNF α va également agir de concert avec l'IL-1 β . Ceux-ci vont causer une augmentation du catabolisme de la MEC de la MS induisant la synthèse des métalloprotéases de matricielle (MMP), à ce niveau (Oehler et *al.*, 2002). En effet, la MS produit des MMP qui vont dégrader la MEC de cette dernière. Celles-ci vont également diffuser dans le liquide synovial et vont aller dégrader le cartilage (Pelletier et *al.*, 2001b). L'activité des MMP peut être modulée par le monoxyde d'azote (NO). En effet, ce dernier peut augmenter l'expression de ces protéases (Evans et *al.*, 1996; Murrell et *al.*, 1995; Hauselmann et *al.*, 1994; Taskiran et *al.*, 1994). Le NO va également diminuer la synthèse des inhibiteurs

tissulaires des métalloprotéases (TIMP), ce qui facilite l'action des MMP (Pelletier et *al.*, 1991).

L'IL-1 β et le TNF α vont également diminuer la synthèse de la matrice cartilagineuse (Pelletier et *al.*, 1993; Martel-Pelletier et *al.*, 1999) et vont stimuler la production de médiateurs lipidiques (prostaglandines (PG), et leucotriènes (LT)) (Ford-Hutchinson et *al.*, 1994).

Les Prostaglandines E₂ (PGE₂) et les leucotriènes B₄ (LTB₄) sont produits non seulement par les cellules synoviales, mais également par différentes cellules dont : les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les neutrophiles et les cellules polymorphonucléaires (PMN) (He et *al.*, 2002). Le LTB₄ a un effet chimiotactique sur les PMN (Oates et Gilkeson, 2001; Levy et *al.*, 2001) qui vont produire de l'IL-1 β ainsi que du LTB₄. De plus, il a été démontré que le LTB₄ accentuait les lésions au niveau du cartilage (Boileau et *al.*, 2002a). Il n'en faut pas plus pour comprendre que le LTB₄ est très important dans le déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice du cartilage et donc, dans la destruction de celui-ci. Les PGE₂ sont responsables des symptômes chez les patients (Dayer et *al.*, 1986; Krane et *al.*, 1985). En effet, celles-ci vont causer une vasodilatation ainsi qu'une perméabilisation des vaisseaux sanguins de la MS (Sugimoto et *al.*, 2000), ce qui se traduit par un œdème et une sensation de chaleur au niveau du genou. Aussi, les médiateurs de l'inflammation (dont les PGE₂) peuvent stimuler directement ou sensibiliser les fibres nociceptives causant ainsi une douleur (Konttinen et *al.*, 1994). Les PGE₂ peuvent également stimuler la production des MMP et ainsi contribuer à la dégradation de la MS et du cartilage (Breyer MD et Breyer RM, 2000). Il semble donc que les PGE₂ soient à même d'affecter le remodelage du cartilage (Goldring et *al.*, 1996).

1.1.2. LE CARTILAGE

La cartilage articulaire, ou cartilage hyalin, est un tissu extrêmement simple : un type cellulaire (chondrocytes) dans une MEC synthétisée par ces cellules. En effet, à l'instar de plusieurs tissus, le cartilage est dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques, et il n'est pas innervé (Elliott et Cawston, 2001; Buckwalter et Mankin, 1998b; Watanabe et *al.*, 1998).

Le cartilage joue deux rôles essentiels au sein de l'articulation. Dans un premier temps, de par sa surface lisse, il assure un mouvement presque sans friction de l'articulation. Deuxièmement, il permet de bien distribuer les forces aux structures sous-jacentes dans l'articulation (Cremer et *al.*, 1998; Muldrew, 2002; Knudson et Knudson, 2001). C'est la structure et la composition du cartilage qui permettent à celui-ci de bien remplir ses fonctions inhérentes à la locomotion.

1.1.2.1. STRUCTURE

La composition et l'organisation du cartilage changent depuis sa surface vers l'os sous-chondral (Muldrew, 2002). Par conséquent, il est possible de séparer ce tissu en quatre ou cinq couches (ou zones), tout dépendant de la différenciation de la zone superficielle en une ou deux couches (Imhof et *al.*, 1999). Donc, de la surface du cartilage vers l'os sous-chondral, nous retrouvons les zones dans l'ordre suivant : la zone superficielle, la zone de transition, la zone radiale (profonde) et finalement, la zone calcifiée (Buckwalter et *al.*, 1988).

1.1.2.2. COMPOSITION

Comme il a été mentionné un peu plus haut, le cartilage est essentiellement composé d'une MEC dans laquelle des cellules (les chondrocytes) sont imbriquées. La matrice représente 90% du poids sec du cartilage (Hardingham et Fosang, 1992)

alors que les cellules ne représentent que 5% du volume de celui-ci (Knudson et Knudson, 2001). La MEC du cartilage se compose essentiellement de collagène, de protéoglycanes et d'eau (Velleman, 2000).

Le collagène représente environ 50% à 60% du poids sec du cartilage (Buckwalter et Mankin, 1998b; Muir, 1995). Nous retrouvons entre autre le collagène de type II, qui est d'ailleurs le type de collagène le plus abondant. En effet, il constitue 90% à 95% du collagène présent dans le cartilage (Burgeson et Nimmi, 1992; Buckwalter et Mankin, 1997a, b; Poole et *al.*, 2001). Le collagène de type II a pour fonction de résister aux forces de tension et de cisaillement. Il existe également d'autres types de collagène dans le cartilage, soient : V, VI, IX, X, XI, XII et XIV (Poole et *al.*, 2001). Ceux-ci sont en concentrations plutôt modestes.

Les protéoglycanes représentent entre 20% et 40% du poids sec du cartilage (Buckwalter et Mankin, 1998b; Mankin et Brandt, 1997). Notons que les agrécans sont les protéoglycanes les plus abondants dans la MEC (Hascall, 1988). Les protéoglycanes sont sulfatés et comportent donc des charges négatives (Velleman, 2000; Hascall, 1988). Ceci fait en sorte que les protéoglycanes se repoussent (Tyyni et Karlsson, 2000) et occupent le plus d'espace possible dans le cartilage (Johnston, 1997). Cette concentration de charges négatives permet également d'attirer l'eau et des solutés dans le cartilage (Velleman, 2000; Tyyni et Karlsson, 2000; Muldrew, 2002). Ces deux caractéristiques des protéoglycanes assurent la viscoélasticité du cartilage ainsi que sa résistance aux forces de compression (Rédini, 2001; Watanabe et *al.*, 1998; Iozzo, 1998; Mow et *al.*, 1992).

L'eau est également une composante importante du cartilage en constituant 60 à 80% de celui-ci (Buckwalter et Mankin, 1997b; Buckwalter et Martin, 1996; Allan et *al.*, 1998; Haq et *al.*, 2003). En plus d'assurer la dureté du cartilage, elle permet également sa lubrification de même que sa nutrition durant le mouvement (Roughley et Lee, 1994; Johnston, 1997).

Il existe également d'autres protéines qui jouent un rôle dans la structure ou le métabolisme du cartilage. Citons la chondronectine (Mankin et Brandt, 2001), et l'anchorine CII qui semblent contribuer à ancrer les chondrocytes à la matrice de collagène (Mollenhauer et *al.*, 1984; Pfaffle et *al.*, 1990; Turnay et *al.*, 1995; Goldring, 2001). Il y a également la protéine de liaison ou « link protein » qui permet de relier les agrécans au hyaluronate (Wight et *al.*, 1991; Roughley, 2001). Nous retrouvons également des traces de lipides dans le cartilage (<1%) (Mankin et Brandt, 2001).

Les chondrocytes ne composent que 5% du volume du cartilage (Roughley et Lee, 1994; Knudson et Knudson, 2001). Ils sont distribués de façon éparse dans le cartilage et se retrouvent dans une sorte de panier formé d'une MEC dense, le tout formant un ensemble fonctionnel, le chondron (Poole, 1997). Les chondrocytes vont synthétiser tous les éléments de la MEC du cartilage (Johnston, 1997; Knudson et Knudson, 2001). Les chondrocytes synthétisent également des cytokines (IL-1) (Goldring, 2000a, 2000b) et des facteurs de croissance (facteur de croissance insulino-mimétique 1 (IGF-1) et facteur de croissance transformant β (TGF β)) (Allan et *al.*, 1998; Buckwalter et Martin, 1996).

1.1.2.3. CARTILAGE ARTHROSIQUE

La dégradation du cartilage peut se diviser essentiellement en trois étapes : les dommages causés à la MEC, la réponse des chondrocytes aux dommages et l'incapacité de ceux-ci à réparer le cartilage (diminution de la réponse des chondrocytes) (Buckwalter et Martin, 1996).

Suite aux dommages infligés au cartilage, il y a activation des chondrocytes. En effet, il y a augmentation de la synthèse des facteurs cataboliques et anaboliques par ces cellules. Il y a également prolifération des chondrocytes qui sont maintenant

regroupés en petits îlots. Le monoxyde d'azote (NO) joue probablement un rôle important dans la réponse des chondrocytes. En effet, ce facteur produit par les chondrocytes (Pelletier et *al.*, 1996; Amin et *al.*, 1995) et stimulé par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF α) (Pelletier et *al.*, 1996; Rediske et *al.*, 1994; Stadler et *al.*, 1991; Stefanovic-Racic et *al.*, 1994) est impliqué dans le catabolisme du cartilage de diverses façons.

Le NO peut interagir avec la cyclooxygénase 2 (COX-2) pour augmenter la synthèse de PGE₂ (Amin et *al.*, 1997). Ce médiateur lipidique va potentialiser les effets des médiateurs de l'inflammation (et donc augmenter la réaction inflammatoire) (Martel-Pelletier et Pelletier, 2001). La PGE₂ permet aussi de moduler le remodelage du cartilage (Goldring et *al.*, 1996). Le NO peut également induire la synthèse de l'IL-1 β . Ce dernier est impliqué dans la dégradation du collagène de type II en activant les MMP et en inhibant les TIMP (Martel-Pelletier et Pelletier, 2001; Martel-Pelletier et *al.*, 1994; Firestein et *al.*, 1991; Dean et *al.*, 1989; Clark et *al.*, 1993; Martel-Pelletier et *al.*, 1991).

En plus de favoriser la dégradation du collagène de la MEC, l'IL-1 β peut altérer la reconstruction de la MEC, résultant ainsi en une déstabilisation de cette dernière. (Goldring et *al.*, 1988). L'IL-1 β va également stimuler la formation d'ostéophytes en bordure de l'articulation (Bunning et *al.*, 1986).

Il n'y a pas que les facteurs produits par les chondrocytes du cartilage qui peuvent influencer la destruction de celui-ci. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, la MS inflammée produit également des cytokines (IL-1 β et TNF α) de même que des médiateurs lipidiques (PGE₂ et LTB₄) qui vont, eux aussi, participer à la destruction de la MEC du cartilage.

Dans la troisième phase les chondrocytes ne sont plus en mesure de compenser la perte des protéoglycanes et du collagène par l'augmentation de la synthèse de ces

constituant, entraînant ainsi une perte nette de la matrice (Rizkalla et *al.*, 1992; Cs-Szabo et *al.*, 1995; Malesud et *al.*, 1995; Cs-Szabo et *al.*, 1997; Huber et *al.*, 2000).

1.1.3. L'OS SOUS-CHONDRAL

L'os est une structure importante au sein de notre organisme. En effet, il assure deux fonctions essentielles. Dans un premier temps, il sert de support afin de permettre aux organismes vertébrés de se tenir debout et de se mouvoir (os longs, ex. : fémur, humérus). L'os procure également une protection pour les organes vitaux (os plats, ex. : crâne, sternum). Il constitue aussi une importante réserve d'ions comme le calcium et le phosphate (Boskey et Posner, 1984; Roberts et *al.*, 1987). L'os sous chondral assure deux fonctions importantes au niveau de l'articulation. En effet, il protège et nourrit en partie le cartilage (Lane et *al.*, 1977; Imhof et *al.*, 1999; Nakano et *al.*, 1986).

1.1.3.1. LA STRUCTURE DE L'OS

La structure de l'os est une continuité entre le tissu cortical et le tissu trabéculaire (Marx et Garg, 1998). Ces deux types de tissus sont présents tout au long de l'os, mais dans des proportions différentes. L'os compact (os cortical) est organisé en cylindres situés autour d'un vaisseau sanguin central (système haversien ou ostéon) (Dequeker, 1994, Carola et *al.*, 1992). L'os trabéculaire constitue la cavité médullaire au sein de l'os. Cette cavité est remplie de moelle osseuse (Marx et Garg, 1998). La cavité médullaire est recouverte de l'endoste contenant des ostéoblastes et des ostéoclastes (Marx et Garg, 1998; Thibodeau et Patton, 2003). Toute la surface de l'os, sauf au niveau des articulations, est recouverte du périoste. Cette couche se divise en deux sections. La section externe est fibreuse et donne la dureté au périoste. La section interne est en contact avec l'os et contient des ostéoblastes (Thibodeau et Patton, 2003).

1.1.3.2. LES CELLULES

Le remodelage osseux est rendu possible grâce aux deux types cellulaires rencontrés dans l'os : les ostéoblastes et les ostéoclastes (Green, 1994, Lajeunesse et Reboul, 2003; Boskey, 2001). Les ostéoblastes sont responsables de la synthèse de la matrice organique et de sa calcification (Owen, 1980). Les ostéoclastes, eux, sont responsables de la résorption osseuse (Ibbotson et *al.*, 1984; Roodman et *al.*, 1987). Il y a aussi les ostéocytes. Ces cellules sont des ostéoblastes moins actifs qui sont emprisonnés dans la matrice minéralisée. Ces cellules sont responsables de la dissolution des minéraux dans leur environnement immédiat (Rubin et Rubin, 2001).

1.1.3.3. COMPOSITION DE L'OS

La majeure partie (90%) de la matrice organique est composée de collagène de type I (Rubin et Rubin, 2001; Boskey, 2001) produit par les ostéoblastes. Le collagène de type I constituera la charpente pour la minéralisation (Dequeker, 1994). Nous y retrouvons également de petites quantités de collagène de types III, V, II et X (Marks et Popoff, 1988). La matrice osseuse contient également des protéoglycanes, de l'eau, des lipides ainsi que d'autres protéines comme l'ostéocalcine, la fibronectine et l'ostéonectine (Robey et *al.*, 1988; Robey et Termine, 1985; Lemann et Lennon, 1972). La phase inorganique de l'os, constituant les deux tiers de la matrice osseuse, consiste essentiellement en des cristaux d'hydroxyapatite (Green, 1994).

1.1.3.4. L'OS SOUS-CHONDRAL ET L'ARTHROSE

Bien que la MS et le cartilage soient les deux composantes les plus affectées au cours de l'arthrose, il n'en demeure pas moins que l'os sous-chondral subisse plusieurs changements au cours de la pathologie (formation d'ostéophytes et de cistes) (Bettica et *al.*, 2002; Burr et Schaffler, 1997). Cette partie de l'articulation est également à l'origine des changements rencontrés au niveau du cartilage. En effet,

l'épaississement (sclérose) de l'os sous-chondral (Huebner et *al.*, 2002; Ham et *al.*, 2002), ainsi que les facteurs produits par celui-ci (IGF-1, IL-1 β , IL-6, PGE₂ et TGF β), auront pour effet de contribuer à la dégradation de la matrice cartilagineuse (Hilal et *al.*, 1999; Hilal et *al.*, 2001; Hilal et *al.*, 1998; Benderdour et *al.*, 1999; Massicotte et *al.*, 2002; Westacott et *al.*, 1997; Guévremont et *al.*, 2003; Dequeker et *al.*, 1993; Pelletier et Martel-Pelletier, 2002).

2. MÉTABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE

L'implication des médiateurs lipidiques dans l'inflammation (PGE₂ et LTB₄ surtout) est majeure. Par conséquent, il convient de discuter de façon détaillée du métabolisme de l'acide arachidonique (AA). La prochaine section touchera les structures, fonctions et localisations des différentes enzymes impliquées dans ce métabolisme. Il sera également question des produits respectifs de chacun de ces enzymes.

2.1. LA PHOSPHOLIPASE A₂ (PLA₂)

La PLA₂ est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des glycérophospholipides membranaires en position *sn*-2, menant à la formation d'acides gras (dont l'AA) et de lysophospholipides. C'est la PLA₂ qui est responsable de la synthèse du substrat le plus utilisé par les enzymes produisant les éicosanoïdes. Par le fait même, c'est l'action de la PLA₂ qui constitue l'étape limitante dans le métabolisme de l'AA (Kudo et Murakami, 2002).

Il existe essentiellement deux types de PLA₂, soient : la PLA₂ sécrétoire (sPLA₂) et la PLA₂ cytosolique (cPLA₂) (Shinohara et *al.*, 1999). La cPLA₂ démontre une préférence marquée pour l'AA comparativement aux autres acides gras.

Suite à une augmentation de la concentration en calcium (de l'ordre du μM) (Clark et *al.*, 1991; Lin et *al.*, 1993) il y a translocation de la cPLA₂ au niveau de la membrane nucléaire (Evans et *al.*, 2001; Hirabayashi et *al.*, 1999; Peters-Golden et *al.*, 1996). Ceci permet à l'enzyme de produire l'AA nécessaire pour les réactions subséquentes dans la synthèse des éicosanoïdes par les COXs et les LOs.

2.2. LES CYCLOOXYGÉNASES (COXS)

Les COXs, ou prostaglandine endoperoxyde H synthases (PGHS), sont les enzymes clés dans le métabolisme de l'AA dans le but de produire des prostanoïdes (prostaglandines (PG), tromboxane (TX) et prostacycline (PGI₂)) (Roth et *al.*, 1975). En effet, elles synthétisent la prostaglandine H₂ (PGH₂) qui est la première étape dans la synthèse des prostanoïdes (de Leval et *al.*, 2002). Jusqu'à une quinzaine d'années, la recherche n'avait démontré l'existence que d'une seule COX (COX-1). Celle-ci était la seule enzyme responsable de la production physiologique de PGs et de leur augmentation de synthèse lors de l'inflammation. Cependant, il est maintenant certain qu'il existe deux isoformes de la COX, dont les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 1. L'une est une isoforme constitutive de 67 kDa (COX-1) tandis que l'autre est une isoforme inductible de 72 kDa (COX-2) (Fletcher et *al.*, 1992; Garavito, 1996).

Tableau 1 : Caractéristiques des COX-1 et -2

Caractéristiques	COX-1	COX-2
Taille ARNm	3 kb	4-4,5 kb
Stabilité ARNm	Stable	Instable
Taille de l'enzyme (aa)	576 aa	587 aa
Expression de l'enzyme	Constitutive	Inductible
Localisation cellulaire	Presque toutes les cellules Surtout dans les plaquettes sanguines	Cellules Stimulées ¹ : - Chondrocytes - Fibroblastes - Monocytes/ Macrophages - Cellules endothéliales et épithéliales - Cellules musculaires lisses - Synoviocytes - Ostéoblastes - Cellules du système reproducteur féminin - Cellules mésangiales - Mastocytes - Astrocytes - Neurones
Localisation intracellulaire	Membrane nucléaire et RE	Plusieurs cellules tumorales Surtout membrane nucléaire
Principales fonctions Biologiques	Agrégation plaquettaire Balance hydrique rénale Cytoprotection gastrique	Désagrégation plaquettaire Inflammation Vasodilatation Résorption osseuse et plusieurs événements pathologiques
AA utilisé	Surtout exogène	Endogène et exogène
Substrat	Surtout l'AA	AA

(modifié de Morita, 2002; 1 : Ju et Neufeld, 2002)

2.2.1. STRUCTURE

Les COX-1 et -2 ont environ 60% d'homologie de séquence (Smith et Marnett, 1994; Smith et *al.*, 1996) bien qu'elles proviennent de gènes distincts

(Tazawa et *al.*, 1994). Ceci fait en sorte que les deux isoformes ont une structure semblable, mais pas identique. Les COXs possèdent trois domaines, soient : un domaine EGF N-terminal, un domaine de liaison en hélice et un large domaine catalytique (Luong et *al.*, 1996). Leur domaine catalytique se divise en deux sites actifs distincts, leur conférant par conséquent deux activités enzymatiques distinctes. Le premier site permet une activité cyclooxygénase qui assure la transformation de l'AA en prostaglandine G₂ (PGG₂) par une réaction avec deux molécules d'oxygène. Le second site assure l'activité peroxydase de l'enzyme ce qui permet la réduction du PGG₂ en PGH₂ (Needleman et *al.*, 1986). La différence majeure entre les deux isoformes réside dans leur structure primaire. En effet, la COX-2 possède un peptide signal tronqué de même qu'une insertion de 18 acides aminés au niveau C-terminal (Smith et *al.*, 1996). Il existe également une différence au niveau du site actif de la cyclooxygénase. Nous retrouvons un résidu Val509 dans la COX-2 alors que nous avons un résidu Ile523 dans la COX-1. Ceci fait en sorte que la COX-2 a un site actif 25% plus grand que dans l'autre isoforme (Kujubu et *al.*, 1991). Il a également été démontré que le site catalytique de la COX-2 possédait une pochette supplémentaire. Cette pochette supplémentaire a pour effet d'augmenter de 17% la taille du site actif de la COX-2 (Kujubu et *al.*, 1991; Smith et *al.*, 2000). La COX-2 peut également adopter plus d'une conformation, permettant ainsi une plus grande flexibilité dans ses interactions (Luong et *al.*, 1996). Ces différences de taille et de forme du site actif entre la COX-1 et la COX-2 ont permis d'élaborer des inhibiteurs sélectifs pour la COX-1 ou la COX-2.

2.2.2. LOCALISATION

Au niveau intracellulaire les COXs sont situées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et au niveau de la membrane nucléaire (Funk, 2001). Toutefois, il avait été démontré auparavant que la COX-2 semblait se retrouver surtout au niveau de l'enveloppe nucléaire (Morita et *al.*, 1995). Une étude plus récente est venue affirmer le contraire en disant que les deux isoformes de la COX

étaient présentes en quantités égales au niveau des feuillettes internes et externes de la membrane nucléaire (Spencer et *al.*, 1998). Cependant, ce point demeure encore mitigé car certains articles récents, dont celui de Ju et Neufeld (2002), mentionnent tout de même que seule la COX-2 se retrouve préférentiellement au niveau de la membrane nucléaire.

La COX-1 est exprimée dans pratiquement toutes les cellules et se retrouve plus particulièrement dans les plaquettes sanguines, qui ne contiennent d'ailleurs que cette isoforme (Funk et *al.*, 1991). La COX-2 peut être induite dans plusieurs types de cellules suite à une stimulation de ces dernières par des cytokines (inflammation) (Jiang et *al.*, 1998; Ristimaki et *al.*, 1994), des facteurs de croissance (konturek et *al.*, 1998; Yucel-Lindberg et *al.*, 1999) ou encore des esters de phorbol (Smith et *al.*, 2000; Crofford et *al.*, 1994). Ces cellules sont résumées dans le tableau 1.

Au niveau tissulaire, la COX-1 se retrouve surtout au niveau du système vasculaire (Goppelt-Struebe, 1995), de l'estomac (Smith et *al.*, 1994b; Masferrer et *al.*, 1994) et du rein (Komhoff et *al.*, 1997; Seibert et *al.*, 1994), bien qu'elle soit présente dans presque tous les tissus. Pour ce qui est de la COX-2, malgré le fait qu'elle soit exprimée surtout lors d'événements tels l'inflammation, il n'en demeure pas moins qu'elle est, elle aussi, exprimée dans certains tissus à l'état physiologique. En effet, il est possible de retrouver la COX-2 au niveau du rein, du cerveau, de l'estomac, de l'endothélium vasculaire (Seibert et *al.*, 1997) et de l'utérus (Slater et *al.*, 1998) (Tableau 2).

Tableau 2 : Localisation des COX-1 et -2 au niveau tissulaire.

Tissus	COX-1	COX-2
Cerveau	Présent; très faible ¹	Présent; très faible ¹
Système vasculaire	Présent ⁵	Présent ⁴
Estomac	Présent ¹	Présent ¹
Foie	Présent; faible quantité ¹	Présent; faible quantité ¹
Glandes mammaires	Présent ¹	Présent ¹
Intestin Grêle	Présent ¹	Présent ¹
Pancréas	Présent; faible quantité ¹	Présent; faible quantité ¹
Poumon	Absent ¹	Présent; grande quantité ¹
Prostate	Présent; grande quantité ¹	Présent; grande quantité ¹
Rein	Présent ^{2,3}	Présent ⁴
Testicules	Présent; faible quantité ¹	Présent; faible quantité ¹
Thymus	Présent; faible quantité ¹	Présent; faible quantité ¹
Utérus	Présent ¹	Présent ¹

(1 : O'Neill et Ford-Hutchinson, 1993; 2 : Komhoff et *al.*, 1997; 3 : Seibert et *al.*, 1994; 4 : Seibert et *al.*, 1997; 5 : Goppelt-Struebe, 1995)

2.2.3 FONCTIONS

Les COXs assurent plusieurs fonctions tant au plan physiologique que pathologique. En effet, la COX-1 est considérée comme étant l'enzyme responsable du maintien de l'homéostasie (Smith et *al.*, 2000). Par conséquent, elle assurera, entre autre, le maintien de l'intégrité du rein ou encore la cytoprotection au niveau de l'estomac (Crofford, 1997; Arakawa et *al.*, 1998; Vane et *al.*, 1998). La COX-2 est considérée comme étant l'enzyme induite lors de l'inflammation (Kutchera et *al.*, 1996). En effet, c'est celle-ci qui causera (via la PGE₂) la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins au niveau de la MS. Cependant, la COX-2 n'est pas une bête noire qu'il faut dénigrer. Elle assure également des fonctions importantes à l'état physiologique (figure 2). En effet, elle permet la guérison des ulcères au niveau de l'estomac et des fractures osseuses (Wallace et *al.*, 1998; Mizuno et *al.*, 1997). Elle est également impliquée dans le maintien de l'homéostasie du rein tout comme la COX-1 (Badr et Jacobson, 1990; Hebert et *al.*, 1995). Comme la COX-1, la COX-2 est impliquée dans le développement de certains cancers, comme le cancer colorectal (Yao et *al.*, 2004). Le tableau 3 fait un résumé des principales fonctions spécifiques à chaque isoforme de la COX.

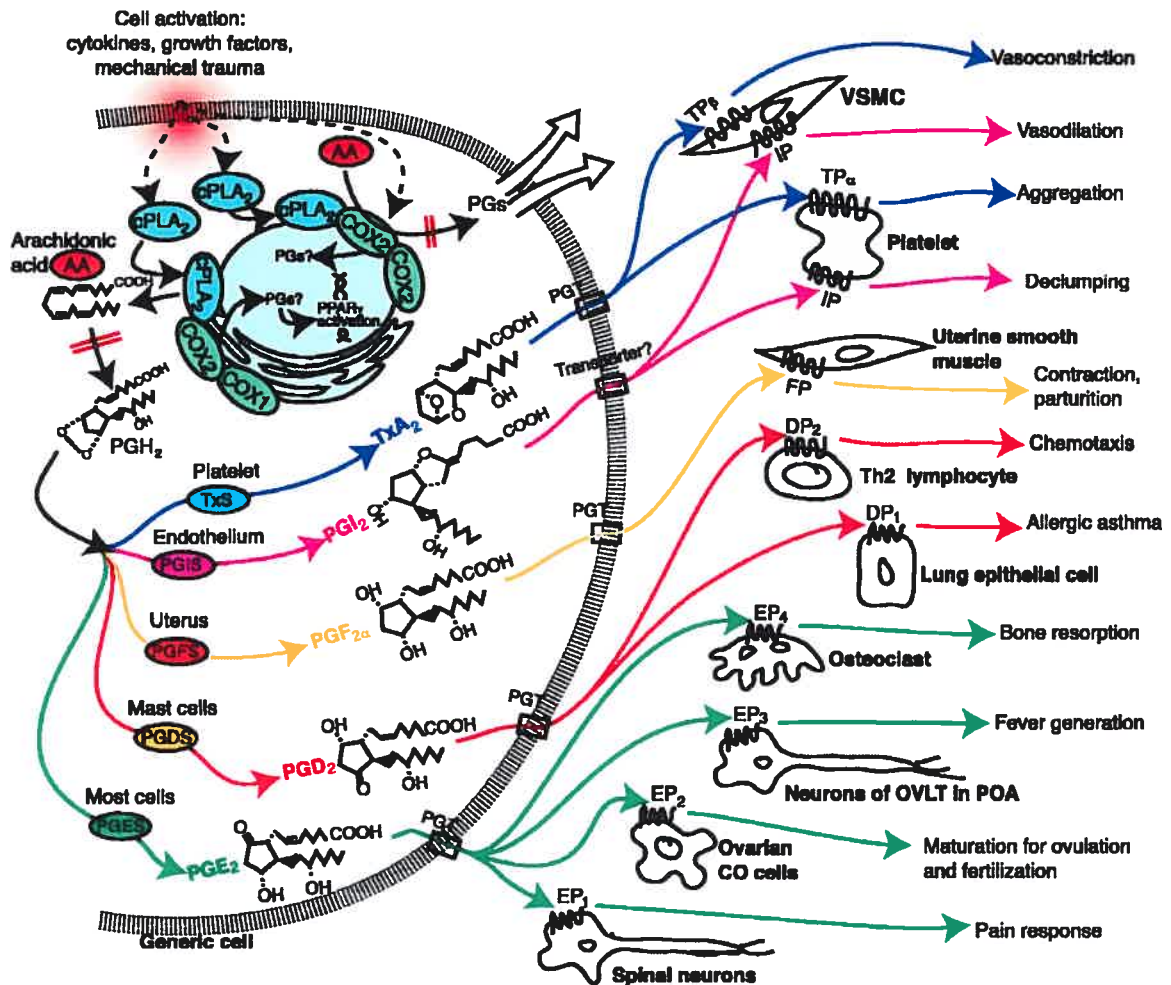


Figure 2 : Fonctions des prostaglandines. L'AA est converti en PGH₂ grâce aux COXs. La PGH₂ est ensuite transformée par les différentes isomérases présentes dans les cellules, menant à la formation de PGs, de thromboxanes ou encore de prostacycline. Ces différents produits vont, par la suite, médier les différentes fonctions des COXs dans les tissus cibles en se liant à leurs récepteurs spécifiques (TP_β, TP_α, IP, FP, DP₁, DP₂, EP₁, EP₂, EP₃, EP₄) (Modifié de Funk, 2001).

Tableau 3 : Fonctions physiologiques des deux isoformes de la COX (modifié de Smith et Langenbach, 2001)

Processus physiologique	COX-1	COX-2	PGs impliquées
Ovulation	Non-essentielle	Essentielle ^{1,2}	PGE ₂
Nidation	Non-essentielle	Essentielle ¹	PGI ₂
Parturition	Essentielle ^{3,6}	Compensatoire ⁴	PGF _{2α}
Résolution de l'inflammation	Non-essentielle	Essentielle ⁵	PGD ₂ , 15-déoxy-PGJ ₂
Agrégation plaquettaire	Essentielle ⁶	Pas d'implication	TXA ₂
Développement périnatal du rein	Non-essentielle ⁶	Essentielle ⁷	Non-déterminé
Développement des cellules T	Spécifique du stade	Spécifique du stade ⁸	PGE ₂
Ulcère gastrique	Inhibition des deux isoformes nécessaires ⁹		Non-déterminé
Cicatrisation d'ulcère	Non-essentielle	Essentielle ^{10,11}	Non-déterminé
Cancer intestinal	Rôles essentiels des deux isoformes ¹²		Non-déterminé
Maintien de l'intégrité du rein	Essentielle ^{13,14}	Essentielle ^{13,14}	PGI ₂ , PGE ₂
Modulation des neurotransmetteurs dans le système nerveux central	Essentielle ¹⁵	--	Non-déterminé

(1 : Lim et *al.*, 1997 ; 2 : Davis et *al.*, 1999; 3 : Gross et *al.*, 1998; 4 : Gross et *al.*, 2000; 5 : Gilroy et *al.*, 1999; 6 : Langenbach et *al.*, 1995; 7 : Komhoff et *al.*, 2000; 8 : Rocca et *al.*, 1999; 9 : Wallace et *al.*, 2000; 10 : Wallace et *al.*, 1998; 11 : Mizuno et *al.*, 1997; 12 : Chulada et *al.*, 2000; 13 : Badr et Jacobson, 1990; 14 : Hebert et *al.*, 1995 ; 15 : Yamagata et *al.*, 1993)

2.2.4 ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Dans un premier temps, pour que les COXs puissent avoir leur substrat, il faut une hydrolyse des glycérophospholipides de la membrane nucléaire pour obtenir l'AA. Cette étape se fait grâce à la sPLA₂ ou la cPLA₂ (Shinohara et *al.*, 1999). Une fois l'AA présenté au niveau du premier site actif (cyclooxygénase), de l'une des deux isoformes de la COX, celui-ci subit d'abord une cyclooxygénation pour former la PGG₂. Par la suite, dans le site peroxydase des COXs, ce dernier produit subit une réduction de son groupement hydroperoxyde pour former la PGH₂ (figure 3) (Needleman et *al.*, 1986 ; Ogino et *al.*, 1977). La façon dont la PGG₂ passe du site cyclooxygénase au site peroxydase n'est pas très claire (Bakhle, 1999).

Une fois la PGH₂ synthétisée, elle est convertie en différentes PGs (par différentes isomérases), en prostacycline (par la prostacycline synthase) et en thromboxanes (par la thromboxane synthase) (figure 3) (de Leval et *al.*, 2002; Jakobsson et *al.*, 1999 ; Kuwamoto et *al.*, 1997 ; Suzuki et *al.*, 1997).

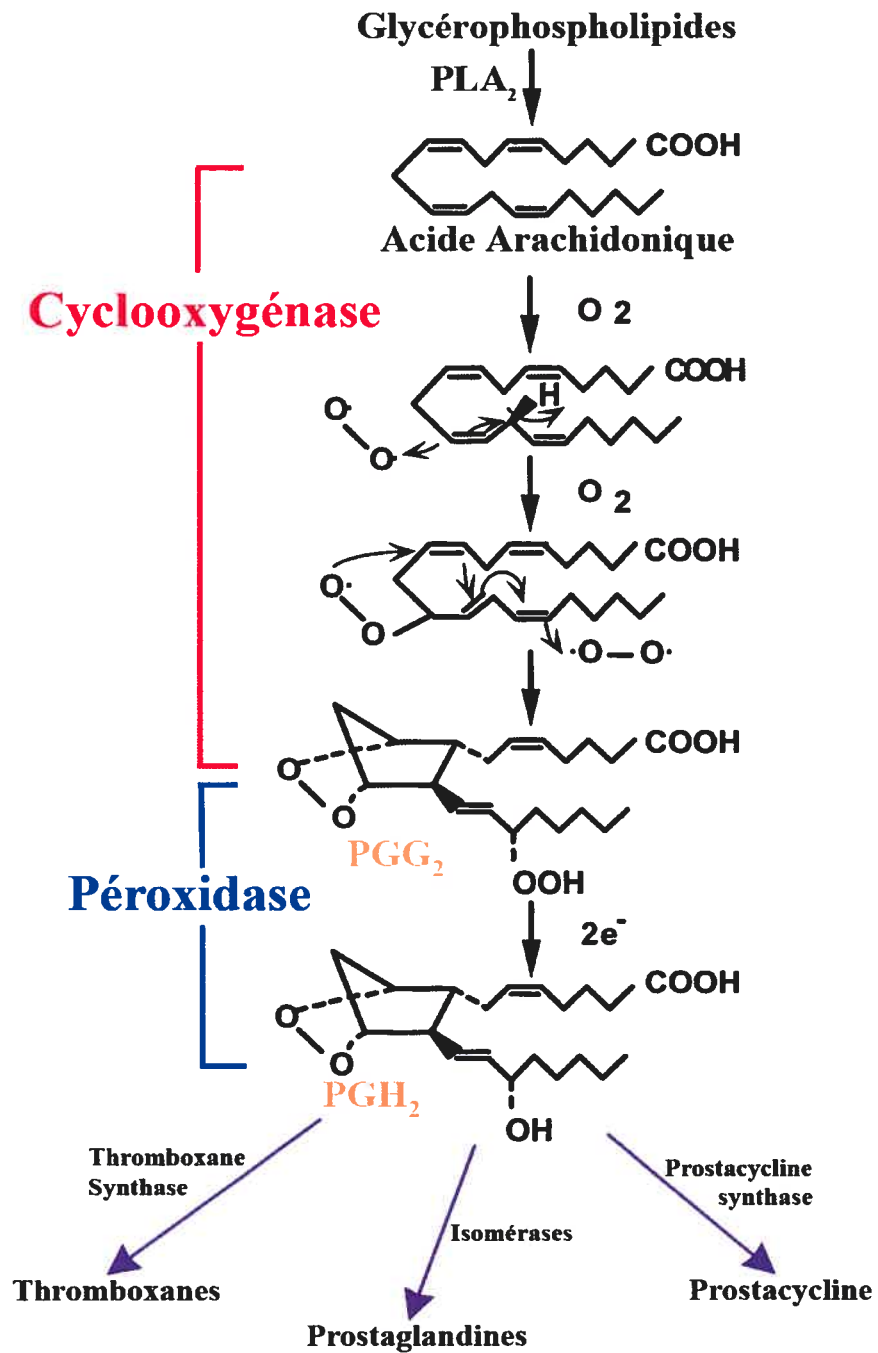


Figure 3 : Métabolisme de L'AA par la cyclooxygénase. Hydrolyse des glycérophospholipides en AA par la PLA₂ suivie de la synthèse (en deux étapes) de la PGG₂ par la COX. Par la suite, les différentes synthases et isomérases utilisent la PGG₂ afin de produire les différents médiateurs lipidiques. (modifié de Smith et al., 2000)

2.2.5 LA COX-3

La COX-3 n'est pas une isoforme différente comme la COX-2 (tableau 4). En effet, elle ne provient pas d'un gène différent. Il s'agit plutôt d'un épissage différent du gène de la COX-1 (Botting, 2003; Chandrasekharan et *al.*, 2002). Cependant, l'existence de cette nouvelle enzyme ne fait pas encore l'unanimité (Dinchuk et *al.*, 2003).

Tableau 4 : Caractéristiques de la COX-3 comparées avec celles des COX-1 et -2. (modifié de Schwab et *al.*, 2003a)

Caractéristiques	COX-1	COX-2	COX-3
Taille de l'enzyme (aa)	576 aa	587 aa	633 aa
ARNm	3 kb	4-4,5 kb	5,2 kb
Poids moléculaire	67 kDa	72 kDa	65 kDa
Expression de l'enzyme	Constitutive	Inductible	Constitutive
Localisation intracellulaire	Membrane nucléaire et RE	Surtout membrane nucléaire	RE
AA utilisé	Surtout exogène	Endogène et exogène	?
Substrat	Surtout l'AA	AA	AA

2.3 LES LIPOXYGÉNASES (LO)

Les LOs (5-LO, 12-LO et 15-LO) sont impliquées dans le phénomène de l'inflammation et de l'asthme entre autre (tableau 5) (Samuelsson et *al.*, 1987; Wasserman et *al.*, 1991). En effet, elles vont synthétiser les leucotriènes (LT) qui sont responsables de ces effets (tableau 6). Elles vont également synthétiser des lipoxines (LX), telle la lipoxine A₄ (LXA₄), qui peuvent avoir des effets plutôt anti-inflammatoires (Serhan et *al.*, 1996). Les LTs peuvent se diviser en deux catégories : dans la première, nous avons le LTB₄ qui a un effet chimiotactique sur les PMN (Borgeat et Naccache, 1990). Dans la deuxième catégorie, les peptidoleucotriènes, nous retrouvons les LTC₄, LTD₄ et LTE₄. Les peptidoleucotriènes ont une action lente (Samuelsson et *al.*, 1987; Haeggström et *al.*, 2002).

Tableau 5 : Caractéristiques générales des LOs.

Caractéristiques	5-LO	12-LO	15-LO
Localisation intracellulaire	Cytosol à l'état non-stimulé ¹¹	Cytoplasme ⁶	Cytosol? ¹ , membrane? ²
Fonctions	Membrane nucléaire à l'état stimulé ^{12,13} Inflammation ²⁰ , asthme ²¹ Effet chimiotactique des LTB4 sur les PMN ^{19,22, 23, 24}	Athérosclérose ¹⁸ Neurotransmission ¹⁸ Dégradation de la membrane mitochondriale lors de la maturation cellulaire. ¹⁸	Impliquée dans l'apoptose? ² Athérosclérose ¹⁸ Neurotransmission ¹⁸ Dégradation de la membrane mitochondriale lors de la maturation cellulaire. ¹⁸ Développement et différenciation cellulaire ²⁵
Substrats	AA ^{14, 20}	AA ¹⁸	AA, biomembranes ³ , lipoprotéines ⁴
Localisation cellulaire	Neutrophiles ¹⁵ Mastocytes ¹⁵ Monocytes/ Macrophages ¹⁵ Lymphocytes ¹⁵ , PMN ¹⁵ Cellules épithéliales ^{16, 17} Synoviocytes ²⁶	Leucocytes ⁶ , plaquettes sanguines, cellules cutanées ^{7,8,9} Synoviocytes ²⁷	Éosinophiles, cellules épithéliales des voies respiratoires ⁵ En plus faible quantité dans les autres cellules ⁵
Taille de l'enzyme	Les LOs ont toutes une taille oscillant entre 662 aa et 676 aa ¹⁰		
Homologie	Les LOs ont entre 35% et 80% d'homologie ¹⁰		

(1 : Rapoport et al., 1979; 2 : Brinckmann et al., 1997; 3 : Kühn et al., 1990; 4 : Belkner et al., 1993; 5 : Ford-Hutchinson, 1991; 6 : Nakamura et al., 1997; 7 : Takahashi et al., 1993; 8 : Hussain et al., 1994; 9 : Chen et al., 1994; 10 : Gillmor et al., 1997; 11 : Luo et al., 2003; 12 : Brock et al., 1997; 13 : Brock et al., 2001; 14 : Lee et al., 1984; 15 : Samuelsson, 1983; 16 : Avis et al., 1996; 17 : Behera et al., 1998; 18 : Yamamoto, 1992; 19 : Silverman et Drazen, 1999; 20 : Bell et Harris, 1999; 21 : Nathan, 1996; 22 : Miller et al., 1987; 23 : Zimmerman et McIntyre, 1988; 24 : Tonnesen et al., 1989; 25 : Kuhn et Thiele, 1999; 26 : Bonnet et al., 1995; 27 : Liagre et al., 1997)

Tableau 6 : Rôles majeurs des leucotriènes. (Boileau, 2002b)

Effets	LT impliquées
Augmentation de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales	LTB ₄
Augmentation de la perméabilité vasculaire	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄
Stimulation du chimiotactisme pour les neutrophiles et pour les autres granulocytes (à un moindre degré)	LTB ₄
Stimulation du chimiotactisme pour les éosinophiles dans la muqueuse des voies respiratoires	LTD ₄ , LTE ₄
Stimulation de la sécrétion d'anion superoxyde et dégranulation des leucocytes	LTB ₄
Stimulation de la libération d'IL-5,-6 et d'IL-8 par les lymphocytes T	LTB ₄
Augmentation de l'expression des récepteurs IgE de faible affinité sur les cellules B et synthèse d'IgE induite par l'IL-4	LTB ₄
Augmentation du tonus musculaire et des sécrétions bronchiques	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄
Prolifération et remodelage des muscles lisses respiratoires	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄

2.3.1 LA 5-LIPOXYGÉNASE

La 5-LO est impliquée dans les deux premières étapes de la synthèse des LTs. Dans un premier temps, cette enzyme va oxyder l'AA en position C5 pour donner l'acide (5S)-hydroxyperoxy-6-trans-8,11,14-*cis*-eicosatetraénoïque (5-HPETE) (Silverman et Drazen, 1999). Dans un deuxième temps, l'activité epoxygénase de la 5-LO va transformer la 5-HPETE en LTA₄, une molécule instable (Maycock et *al.*, 1982). C'est ici que se termine le rôle de la 5-LO. Par la suite, la LTB₄ synthase vient catalyser la conversion du LTA₄ en LTB₄ (Samuelsson, 1983). Il est également possible de former le LTC₄ à partir du LTA₄ grâce à une réaction de ce dernier avec le glutathion, réaction catalysée par la LTC₄ synthase (Silverman et Drazen, 1999). Par la suite, à partir du LTC₄, il est possible de produire le LTD₄ grâce à la γ -glutamyl transférase (Orning et Hammarstrom, 1980) et le LTE₄ grâce à une dipeptidase (Lee et *al.*, 1984).

La 5-LO est essentielle dans la synthèse des LTs, mais elle ne pourrait pas assurer ses fonctions sans l'aide de cofacteurs. En effet, cette enzyme est activée en présence d'une augmentation de Ca²⁺ et d'ATP dans le cytoplasme (Riendeau et *al.*,

1991; Ueda *et al.*, 1986; Aharony et Stein, 1986). La 5-LO, qui est normalement présente dans le cytoplasme, se déplace alors vers la membrane nucléaire (translocation). Pour que tout soit parfait, il faut la protéine activatrice de la 5-LO (FLAP). Cette protéine imbriquée dans la membrane nucléaire a pour fonction de présenter l'AA issu de la cPLA₂ à la 5-LO (figure 4) (Rådmark, 2002; Mancini *et al.*, 1993).

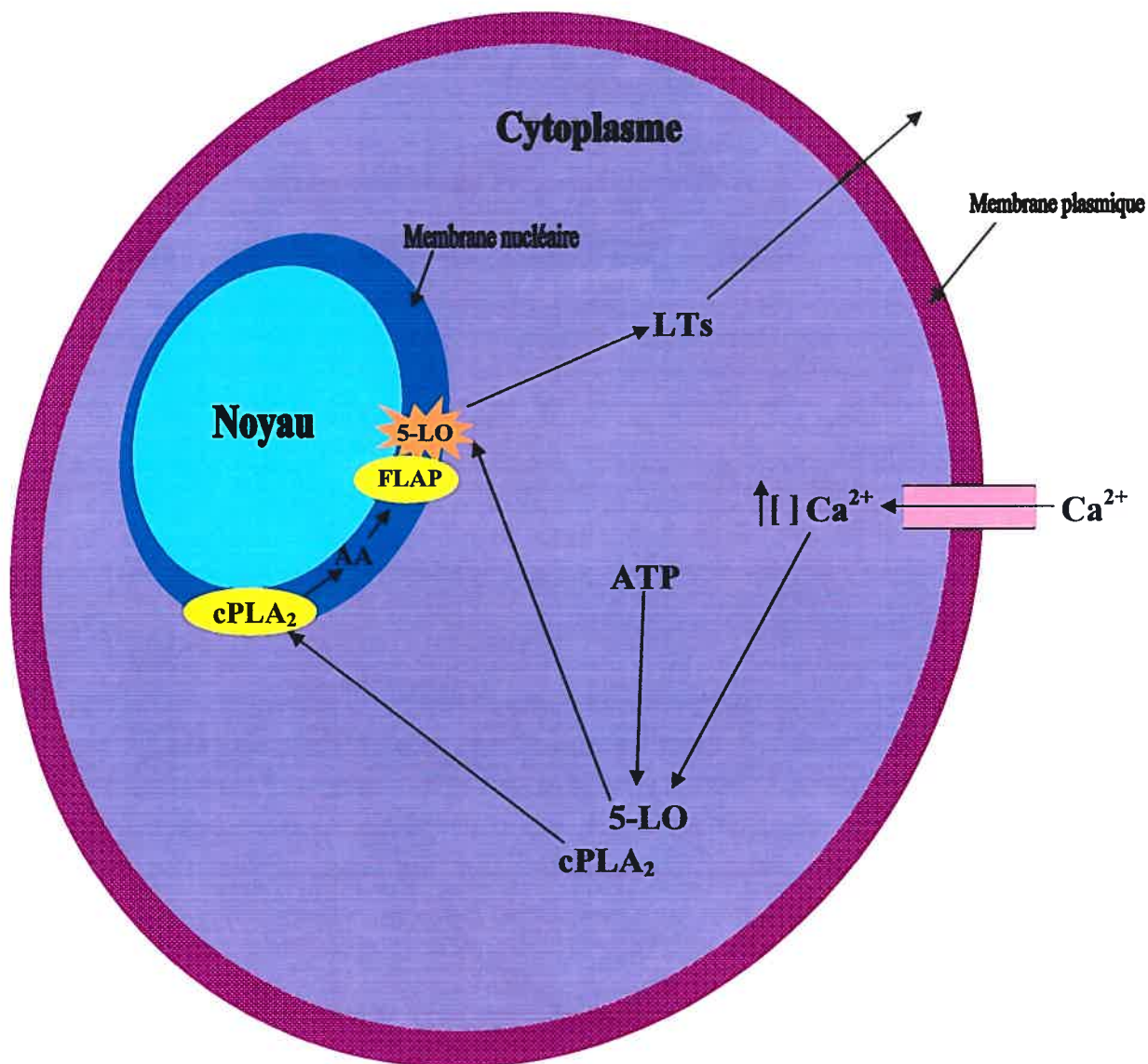


Figure 4 : Métabolisme de l'AA par la 5-LO. Suite à une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, il y a translocation de la 5-LO et de la cPLA₂ à la membrane nucléaire. À ce niveau, la PLA₂ hydrolyse les glycérophospholipides de la membrane nucléaire pour produire l'AA. Ce dernier est présenté à la 5-LO par la FLAP et il y a synthèse de LTs par la 5-LO.

2.3.2 LES 12- ET 15-LIPOXYGÉNASES

La 12-LO et la 15-LO vont catalyser la synthèse de médiateurs un peu de la même façon que la 5-LO. En effet, elles vont oxyder l'AA en position C12 et C15 respectivement (Silverman et Drazen, 1999), ce qui donnera la 12-HPETE et la 15-HPETE respectivement. Il s'en suivra d'une réduction de ces produits pour donner la 12-HETE et la 15-HETE (Samuelsson et *al.*, 1987). Cependant, contrairement à la 5-LO, les 12-LO et 15-LO n'ont pas besoin de Ca^{2+} et d'ATP pour être activées (McMillan et Walker, 1992). Ces enzymes vont ultimement produire, entre autre, les LXA_4 . (Serhan et *al.*, 1999). Notons que la 5-LO est également impliquée dans la synthèse de LXA_4 (Serhan, 1997; Serhan et *al.*, 2000; Serhan et Oliw, 2001). Ce médiateur est reconnu pour avoir des effets anti-inflammatoires. La figure 5 nous donne un bon résumé des voies de synthèse des lipoxygénases.

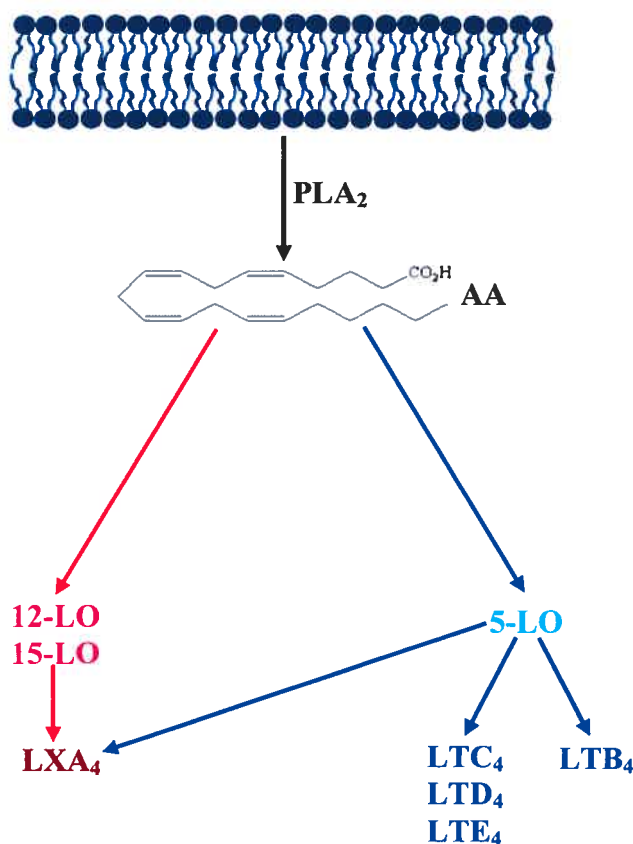


Figure 5 : Voies métaboliques des lipoxygénases. Suite à l'hydrolyse des glycérophospholipides de la membrane nucléaire, l'AA est converti par les différentes LOs pour former différents médiateurs tel le LTB_4 ou encore la LXA_4 .

3. LES ANTI-INFLAMMATOIRES

3.1. LES AINS

Les AINS sont les molécules thérapeutiques les plus utilisées dans le soulagement de l'inflammation dans plusieurs pathologies tel que l'arthrose (Golden et Abramson, 1999). L'aspirine ou l'acide acétylsalicylique (ASA) est sans doute l'AINS le plus utilisé à l'heure actuelle. Bien que les AINS aient beaucoup de bienfaits pour le soulagement de la douleur, il n'en demeure pas moins qu'ils sont responsables de nombreux dommages collatéraux. Parmi ces méfaits, nous comptons les troubles gastro-intestinaux (ulcères), la perte de l'intégrité du rein (Mitchell et Warner, 1999).

Les différents effets secondaires rencontrés avec les AINS seraient reliés à la perte d'activité de la COX-1 (Simon, 1999a). En effet, celle-ci produit des PGE₂ ayant un effet protecteur au niveau de l'estomac (Wallace et *al.*, 1995). De plus, ces prostaglandines sont essentielles au maintien de l'homéostasie du rein. Ces produits de la COX-1 sont également très importants dans le système cardiovasculaire. Ils sont responsables de la synthèse des PGI₂ au niveau des plaquettes sanguines, sachant que ce type de PG a un effet anti-thrombotique (Moncada et *al.*, 1976; Radomski et *al.*, 1976; Sneddon et Vane, 1988).

3.1.1. MODE D'ACTION

Dans un premier temps, l'ASA inhibe la synthèse des PGE₂ en acétylant le site cyclooxygénase des COXs tout en laissant le site peroxydase intact. L'acétylation de la COX-1 empêche celle-ci de complètement oxyder l'AA. Cependant, l'ASA n'inhibe pas l'activité cyclooxygénase de la COX-2. En effet, la COX-2 est toujours capable d'oxyder l'AA, mais le produit final sera différent. Elle produira la 15-HETE (Clària et Serhan, 1995; Serhan et Oliw, 2001). Celle-ci sera convertie par les LOs

pour donner la 15-epi-lipoxine A₄ qui aurait plutôt des effets anti-inflammatoires de même qu'un effet protecteur au niveau de l'estomac lorsque l'ASA est utilisé à plus faible dose et qu'il n'est pas combiné avec d'autres AINS (Clària et Serhan, 1995).

D'autres AINS ont un mode d'action différent. En effet, le naproxen, un inhibiteur de COX-1 et de COX-2, va tout simplement agir comme un analogue de substrat. Ceci signifie qu'il prend la place de l'AA au niveau du site cyclooxygénase de l'enzyme (Kalgutkar et al., 2000). De cette façon, l'AA n'a pas accès au site actif et ne peut pas être métabolisé.

Ce ne sont pas tous les AINS qui inhibent les COXs de la même façon. En effet, le Naproxen inhibe préférentiellement la COX-1 avec une IC₅₀ de 0,6 à 4,8 µM comparativement à une IC₅₀ de 2,0 à 28,4 µM pour la COX-2 (Barnett et al., 1994; Laneuville et al., 1994). Par contre, le NS-398 inhibe plus efficacement la COX-2 que la COX-1 avec une IC₅₀ de 1,77 µM et de 75 µM respectivement (Barnett et al., 1994). Cette particularité du NS-398 ferait en sorte que son utilisation comporte moins de risque pour la muqueuse gastrique. Il a également été démontré que le NS-398 inhibait non seulement l'activité de la COX-2, mais qu'il inhibait aussi l'expression de son gène dans les synoviocytes arthrosiques humains (Di Battista et al., 2001).

3.2. LES INHIBITEURS SÉLECTIFS DE COX-2

Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 sont une réponse à un besoin de diminuer les effets secondaires des AINS tout en conservant leurs effets thérapeutiques. Pour réaliser cette prouesse, la recherche a su tirer avantage des différences entre les deux isoformes. En effet, la différence majeure entre la COX-1 et la COX-2 se situe au niveau de la partie cyclooxygénase de leur site actif. Le fait que celui de la COX-2 est plus large et contienne une pochette latérale supplémentaire a permis de produire des inhibiteurs spécifiques de COX-2. Ceux-ci peuvent s'imbriquer dans son site

catalytique sans pour autant aller se loger dans celui de la COX-1 puisque cette dernière a une plus petite taille. Ce type d'inhibiteur fonctionne de la même façon que les AINS (à l'exception de l'ASA) en agissant comme un analogue de substrat (Kalgutkar et *al.*, 2000).

Parmi les inhibiteurs sélectifs de COX-2 nous avons le Vioxx (ou Rofecoxib). En effet, ce médicament possède une IC_{50} de 0,5 μM pour la COX-2 et de 19 μM pour la COX-1 (Prasit et *al.*, 1999). Certes, cet inhibiteur, comme tous les autres de sa catégorie, va contribuer à diminuer les troubles gastro-intestinaux. Ceci est possible car les inhibiteurs sélectifs de COX-2 gardent l'activité de la COX-1 intacte au niveau de la muqueuse. Cependant, d'autres effets secondaires peuvent survenir avec leur utilisation.

Comme il a été mentionné dans le chapitre précédent, la COX-2 joue plusieurs rôles physiologiques. Par conséquent, en inhibant cette enzyme nous risquons de perturber l'homéostasie ou l'intégrité des tissus concernés. Au niveau de l'estomac, il a été démontré que la COX-2 jouait un rôle dans la cicatrisation des ulcères (Reuter et *al.*, 1996; Mizuno et *al.*, 1997; Ukawa et *al.*, 1998), rendant l'utilisation de ces inhibiteurs plus problématique pour les personnes ayant déjà des lésions gastriques. Nous retrouvons le même genre de problème au niveau du rein. En effet, les PGE_2 et PGI_2 jouent un rôle dans l'intégrité et la fonction du rein. Donc, les patients prenant des inhibiteurs sélectifs de COX-2 ou des AINS seraient plus à risque d'avoir des problèmes rénaux, mais dans une incidence beaucoup moins grande que les troubles gastro-intestinaux (Vane et *al.*, 1998; Rossat et *al.*, 1999). Il en va de même pour le système cardiovasculaire. La COX-2 est reconnue pour jouer un rôle protecteur à ce niveau. En effet, cette enzyme semble supprimer, entre autre, la prolifération cellulaire (Bishop-Bailey et *al.*, 1997), la relâche de cytokines (Mithcell et Evans, 1998), de même que l'expression de récepteurs d'adhésion (Bishop-Bailey et *al.*, 1998) dans les événements inflammatoires au niveau des muscles lisses des vaisseaux sanguins.

Une lacune des inhibiteurs sélectifs de COX-2, de même que pour les AINS, est leur incapacité à inhiber la synthèse de LTB₄. Il est reconnu que ces inhibiteurs sont efficaces dans le traitement de l'inflammation. Par contre, quand les LTB₄ se mettent de la partie, rien ne va plus. En effet, en laissant le champ libre aux LTB₄, ces inhibiteurs permettent l'entretien de l'inflammation au niveau de la MS et des lésions au niveau du cartilage. En effet, Boileau et *al.* (2002a), ont démontré qu'une inhibition des LTB₄ pouvait diminuer les lésions cartilagineuses. Aussi, ce même médiateur, de par son effet chimiotactique sur les PMN, jouerait un rôle dans les lésions gastriques. Des recherches récentes sont venues confirmer ceci en démontrant qu'une inhibition de la synthèse des LTB₄ par un inhibiteur de 5-LO (ex. : le NDGA qui inhibe les LOs de façon générale) ou un inhibiteur mixte COX/5-LO pouvait réduire les lésions gastriques induites par l'ajout d'inhibiteurs des COXs à l'ASA (Fiorucci et *al.*, 2003).

3.3. LA LICOFELONE

La Licofelone (ML3000 auparavant) fait partie d'une nouvelle classe d'inhibiteurs mixtes. Elle inhibe la 5-LO et les COXs en agissant comme un analogue de substrat (Tries et *al.*, 2002; Laufer, 2001). La Licofelone a la possibilité d'inhiber simultanément la voie de synthèse des COXs et de la 5-LO de façon équilibrée. En effet, l'IC₅₀ est de 0,18 µM à 0,23 µM pour les COXs et de 0,16 µM à 0,21 µM pour la 5-LO (Laufer et *al.*, 1994).

Comme il a été mentionné plus haut, les AINS et les inhibiteurs spécifiques de COX-2 n'inhibent pas la voie de la 5-LO. Or, il a été démontré que l'inhibition de la voie de synthèse des COXs pouvait stimuler la voie de la 5-LO, et par conséquent, accroître la synthèse des leucotriènes, et plus particulièrement celle des LTB₄ (Hudson et *al.*, 1993; Kobayashi et *al.*, 1993; Paredes et *al.*, 2002). Ceci représenterait le phénomène de « shunt » entre ces deux voies de synthèse. C'est ce phénomène qui serait en partie responsable, entre autre, des troubles gastro-

intestinaux (Tegeter et *al.*, 2000; Whittle et *al.*, 1985). C'est à ce niveau que la Licofelone démontre son avantage par rapport aux autres anti-inflammatoires en empêchant le « shunt », et par le fait même, en réduisant les incidents gastriques. Par conséquent, la force majeure de la Licofelone est sa plus grande tolérance au niveau gastrique (Alvaro-Gracia, 2004) tout en étant un anti-inflammatoire efficace (Tries et *al.*, 2002).

La Licofelone comporte également d'autres effets bénéfiques. Entre autre, elle possède un effet anti-thrombotique (Celotti et Durand, 2003). Elle permet également de diminuer les lésions au niveau du cartilage lors de l'inflammation (Jovanovic et *al.*, 2001; Boileau et *al.*, 2002a; Pelletier et *al.*, 2002; Brune, 2004). Du côté du système cardiovasculaire, le nouvel anti-inflammatoire mixte ne semble pas causer de problème. En effet, l'inhibition équilibrée des COXs et de la 5-LO semble prévenir le déséquilibre entre la synthèse de PGI₂ et de TXA₂ qu'il est possible de rencontrer avec les AINS et les inhibiteurs spécifiques de COX-2 (Martel-Pelletier et *al.*, 2003).

Un des effets secondaires de la Licofelone serait le développement de troubles rénaux (Bannwarth, 2004), mais rien n'est encore sûr. La figure 6 offre un bon résumé des modes d'actions des différents inhibiteurs.

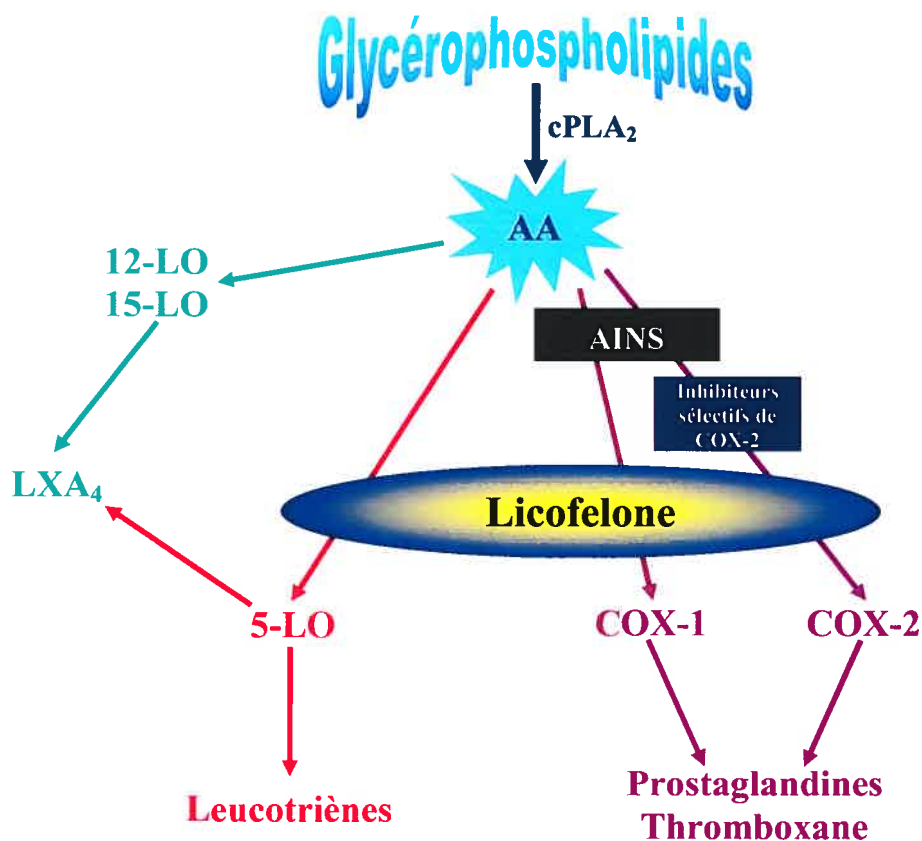


Figure 6 : Inhibition des voies métaboliques de l'AA par les différentes classes d'inhibiteurs. Les différents types d'anti-inflammatoires ont des actions différentes sur le métabolisme de l'AA. Les AINS vont inhiber de façon non-sélective la voie des COXs, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 vont inhiber spécifiquement la COX-2 et la Licofelone, un inhibiteur mixte, va inhiber à la fois les COXs et la 5-LO.

3.4. LE NDGA

Le NDGA est un inhibiteur sélectif des LOs. En effet, cette molécule a la propriété d'inhiber les 5-, 12- et 15-LO avec une IC₅₀ de 0.18μM, 5.1μM et 0.11μM respectivement (Whitman et al., 2002). Le NDGA inhibe l'activité des LOs par un mécanisme d'oxido-réduction (Kemal et al., 1987). Cependant, cette molécule a été retirée du marché puisqu'elle est hépatotoxique, mais elle peut être utilisée *in vitro* (Evan et Gardner, 1979; Gardner et al., 1987).

Comme il a été mentionné, l'inflammation de la membrane synoviale est impliquée dans le développement de l'arthrose. Ceci est dû aux différents médiateurs lipidiques (PGE_2 et LTB_4), cytokines, et protéases produits par la MS. Des recherches récentes ont également démontrées, dans d'autres tissus, l'existence d'un « shunt » de la voie de synthèse des PGs vers celle des LTs quand la synthèse des PGE_2 est inhibée. Ce phénomène implique donc une augmentation de la synthèse des LTB_4 . Il serait donc possible que ce phénomène puisse se produire également au niveau de la membrane synoviale. En effet, le LTB_4 (produit par la MS lors de son inflammation) est impliqué dans l'accentuation des lésions au niveau du cartilage. Le but de notre travail était d'élucider les mécanismes biologiques et moléculaires impliqués dans la production des PGE_2 et du LTB_4 au sein de la MS. Les différents AINS (Naproxen, NS-398), les inhibiteurs spécifiques de COX-2 (Vioxx), les inhibiteurs des LOs (NDGA) et la Licofelone (inhibiteur mixte) nous offrent l'opportunité d'étudier ce « cross-talk » entre les voies de synthèse des COXs et des LOs. En élucidant ce phénomène, il sera alors possible de mieux cibler les traitements tout en diminuant les effets secondaires.

MÉTHODOLOGIE

LISTE DES PRODUITS

Tris (Laboratoire Roche, Beauport, Qc)
NaCl (Laboratoire Roche, Beauport, Qc)
Tween-20 (Fisher, Montréal, Qc)
Triton-X100 (Sigma, St-Louis, Mo)
Membrane de nitrocellulose (BioRad, Mississauga, On)
Anticorps anti-COX-2 (Cayman Chemical, Ann Harbor, Mi)
Anticorps anti-lapin (Pierce)

TAMPONS

T-TBS (1L) : 20 mM Tris (2.422 g)
0.15 M NaCl (8.766 g)
Ajuster le pH à 7.5
0.1% Tween-20 (1 mL)

Tampon Tris-NaCl : 20mM Tris
150mM NaCl

EXTRACTION DE PROTÉINES

Après l'incubation des explants de MS avec les différents inhibiteurs, ces derniers sont pesés et conservés dans 1 mL de tampon de Tris-NaCl. Au moment de l'extraction des protéines, un volume supplémentaire de tampon tris-NaCl est ajouté (jusqu'à 10 fois la masse de l'explant). Du Triton (concentration 100X) est également ajouté, à raison de 0,3% du volume final de tampon. Les explants sont par la suite homogénéisés. Les échantillons sont ensuite centrifugés (12,000g, 15 minutes à 4°C).

Seul le surnageant est récupéré en faisant attention de ne pas aspirer les lipides à la surface. Les protéines sont ensuite dosées à l'aide d'un dosage BCA (Pierce BCA Protein Assay, Rockford, Illinois).

IMMUNOBUVARDAGE

Pour la migration des protéines, 10 µg de protéines sont déposées dans les puits. Le gel de concentration est de 4% et le gel de résolution est de 10%. La migration des protéines se fait à 120 Volts pendant 90 minutes. Par la suite, le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose se fait à 120 Volts pendant 1 heure à 4°C. Ensuite, un blocage de la membrane avec 5% de lait dans le tampon T-TBS (concentration 1X) est effectué toute une nuit à 4°C. Suivant ce blocage, une incubation d'une nuit à 4°C est faite avec le premier anticorps (COX-2). L'anticorps anti-COX-2 est polyclonal. Ensuite, une incubation d'une heure est faite à température de la pièce avec l'anticorps secondaire (anti-lapin). Par la suite, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant 1 minute avec un réactif chimioluminescent (Pierce), avant d'être exposée sur un négatif qui est par la suite développé manuellement. Le reste de la méthodologie est décrite dans l'article qui suit.

RÉSULTATS

LPS	-	+	+	+	+	+	+	+
NS	-	-	+	+	+	+	+	+
Licofelone 10^{-9} M	-	-	-	+	-	-	-	-
Licofelone 10^{-8} M	-	-	-	-	+	-	-	-
Licofelone 10^{-7} M	-	-	-	-	-	+	-	-
Licofelone 5×10^{-6} M	-	-	-	-	-	-	+	-
Licofelone 10^{-6} M	-	-	-	-	-	-	-	+



Figure 7 : Résultats complémentaires : effet de la Licofelone sur l'expression de la COX-2. Les deux séries de bandes sont des duplicatas d'une même expérience.

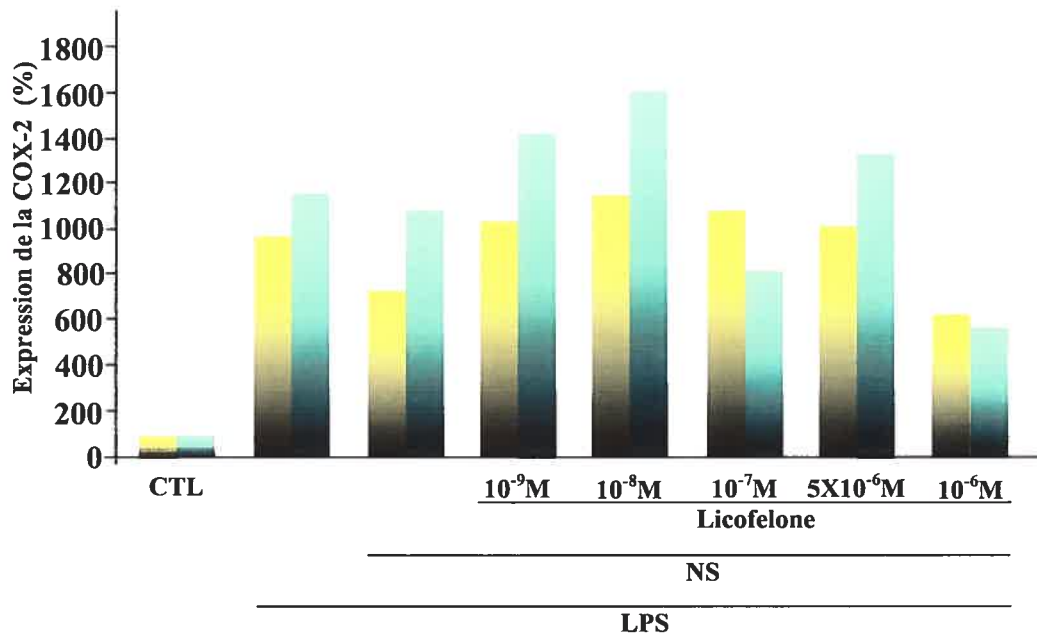


Figure 8 : Résultats complémentaires : quantification de l'expression de la COX-2 sous l'effet de la Licofelone. Les bandes jaunes et les vertes sont des duplicatas d'une même expérience. Les jaunes correspondent à la première série de bandes de la figure 7 et les vertes à la deuxième série de bandes de cette même figure.

Comme il a été décrit plus tôt, il est possible d'induire l'expression de la COX-2. En effet, les figures 7 et 8 représentent différentes stimulations en présence de LPS, un agent bactérien irritant induisant, entre autre, une augmentation de l'expression de la COX-2. Après une incubation de 72 heures en présence de LPS, nous voyons une forte augmentation de l'expression de l'enzyme comparativement au contrôle. Toujours dans des conditions stimulées, l'ajout de NS-398 (1 μM), un inhibiteur préférentiel de la COX-2, semble diminuer l'expression de cette dernière. L'ajout de Licofelone (en plus du NS-398) à des concentrations sous-micromolaires ne semble pas avoir un très grand effet sur la COX-2, si ce n'est une légère augmentation de cette enzyme comparativement à l'état stimulé. Il est possible que ces résultats obtenus avec la Licofelone (10^{-9}M à 10^{-7}M) soient dus à l'aspect hétérogène de la MS. Cependant, avec une concentration de 1 μM (dose thérapeutique de la Licofelone) il y a une diminution de l'expression de la COX-2. Ceci laisse croire que les LTB_4 pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'expression de la COX-2. Une concentration plus élevée de Licofelone (5 μM) cause une augmentation de l'expression de la COX-2, ce qui pourrait être dû à un effet irritant de la molécule à des concentrations plus élevées.

**Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic
synovial membranes: regulating factors for IL-1 β synthesis**

Patrick Marcouiller, Jean-Pierre Pelletier, Mélanie Guévremont, Johanne Martel-
Pelletier, Pierre Ranger*, Stefan Laufer** and Pascal Reboul

Patrick Marcouiller, MSc

Jean-Pierre Pelletier, MD

Mélanie Guévremont, MSc

Johanne Martel-Pelletier, PhD

Pierre Ranger, MD*

Stefan Laufer, PhD**

Pascal Reboul, PhD

Osteoarthritis Research Unit, Hôpital Notre-Dame, Centre hospitalier de l'Université
de Montréal, Montréal, Québec, Canada

*Department of Orthopaedics, Hôpital Sacré-Coeur, Montréal, Québec, Canada

**Eberhard-Karls-University, Tübingen, Germany

Address correspondence to: Pascal Reboul, PhD, Unité de recherche en arthrose, CR-
CHUM Centre hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 rue Sherbrooke Est,
Pavilion de Sève, Y-2604, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1; Tel: (514) 890-8000
ext. 28942; Fax: (514) 412-7583; XXXXXXXXXX

ABSTRACT

Objectives: To study the mechanisms responsible for the cross-talk between the LOX and COX pathways in human osteoarthritic (OA) synovial explants and to confirm the arachidonic acid (AA) shunting phenomenon and its impact on IL-1 β synthesis.

Methods: Synovial membrane explants were cultured in the absence or presence of different drugs that inhibit COX and/or LOX activities. Levels of PGE₂, LTB₄, lipoxin A₄, and IL-1 β were measured.

Results: When membrane explants were incubated with naproxen (COX inhibitor), under unstimulated conditions, the production of LTB₄ was dose-dependently enhanced, reaching a 5-fold increase over the control with naproxen (90 μ g/ml). This shunt could be partially reversed by the addition of exogenous PGE₂. Under LPS stimulation, both licofelone (COX/LOX inhibitor) at therapeutic concentrations and NDGA (LOX inhibitor) inhibited LTB₄ production whereas naproxen did not amplify the LPS-induced LTB₄ production. Conversely, by using NDGA, it was found that a shunt of AA from the LOX to the COX pathway did not occur. Under LPS conditions, both naproxen and licofelone inhibited LXA₄ inducing an increase in the LTB₄/LXA₄ ratio with naproxen treatment but not with licofelone. Under these conditions, naproxen treatment induced a higher level of IL-1 β production.

Conclusion: We demonstrated in OA synovium that a shunt from AA to the LOX pathway occurred and that treatment with a non-selective COX inhibitor could increase the production of LTB₄ and secondarily the synthesis of IL-1 β . Therefore, treatment with licofelone, which act on both COX and LOX pathways, may have some interesting properties in the treatment of OA.

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most common of arthritic diseases and is characterized by progressive loss of articular cartilage due to matrix degradation and repair mechanisms as well as remodeling of the subchondral bone and formation of osteophytes¹⁻³. Synovitis is often observed and is considered to be secondary to the changes in the other tissues within the joint. It is a key event in the pathogenesis of the disease, and it appears to be fundamental to the appearance and progression of cartilage lesions⁴. Synovium has been demonstrated to be one of the main sources for the production of pro-inflammatory mediators, such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), which increase cartilage catabolism⁵⁻⁷. These cytokines stimulate the synthesis and release of lipid mediators, derived from cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) metabolism of arachidonic acid (AA), such as prostaglandins (PG) and leukotrienes (LTs), which are etiologically associated with arthritic and inflammatory diseases⁸⁻¹⁰.

Recently, new studies have focused more particularly on understanding the roles of LTs. Studies in animal models as well as clinical trials have convincingly shown the potential of drugs that inhibit LOX-derived LTs in the treatment of rheumatic diseases¹¹⁻¹³. LTs play a major role in the inflammatory process¹⁴⁻¹⁶. They are synthesized via 5-LOX, an enzyme which requires the presence of the 5-LOX activating-protein (FLAP) in intact cells. The activity of 5-LOX is also stimulated by calcium in intact cells whereas this is not required in *in vitro* experiments with broken cells¹⁷. The last biologically active metabolites of the 5-LOX cascade are leukotriene B₄ (LTB₄) and the so-called cysteinyl leukotrienes (LTC₄, LTD₄ and LTE₄), which are all derived from unstable intermediate LTA₄¹⁸. LTB₄ stimulates the production and release of pro-inflammatory cytokines from macrophages, lymphocytes and, as recently discovered, from synovial membrane^{10 19}.

Lipoxins (lipoxygenase interaction products, LXs) are yet another group of lipid mediators formed during AA metabolism. They are generated during the cellular interactions, which occur as part of the multicellular host response to inflammation. LXs are formed by transcellular metabolism from an intermediate derivative (5(6) epoxytetraene), which gives rise to the metabolically active products LXA₄, LXB₄ or 1S(R)HETE for 15-epi-LXs (aspirin-triggered LXs). They are synthesized not only via the 5-LOX pathway but also by the action of two other enzymes, 12-LOX and 15-LOX^{20 21}. LXs can be considered as stop-signal mediators, which possess anti-inflammatory effects. It has recently been shown that COX and LOX pathways can interact^{16 22}. Our group has demonstrated that in human OA osteoblasts, NS398, a specific COX-2 inhibitor, could induce a shunt from the production of PGE₂ to LTB₄, thereby increasing the production of LTB₄²³.

The present study was performed to explore the presence of an AA shunt in human OA synovial explants, provide evidence and delineate the mechanisms responsible for cross-talk between the COX and LOX pathways, and examine the impact of this shunt on the level of IL-L β synthesis. In addition, we studied the effect of the pharmacological modulation of the COX and/or LOX pathways by drugs, including NSAIDs with different inhibitory activities.

MATERIALS AND METHODS

Synovial membrane cultures

Human synovial membranes were obtained from 14 OA patients (aged 66 ± 7 , mean \pm SD; M/F 4/11) undergoing arthroplasty of the knee and who had been diagnosed based on ACR criteria²⁴. This study was approved by our institutional ethical and scientific committee. OA synovial membranes were aseptically dissected completely free from underlying fibrous and adipose tissue under a dissecting microscope, as previously described¹⁰. The present study was performed according to

previous work done by our unit which established the optimal experimental conditions under which to study the synthesis of LTB₄ and cytokines, such as IL-1 β and TNF α , in human synovial explants¹⁰. Explant samples (~200 \pm 50 mg, in duplicate) were divided randomly into experimental groups and incubated for 24-36 hours (washout period) in explant culture medium [HB-DMEM + 10% FBS + Pen-Strep (100 U/100 μ g)] at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂/95% air prior to experimentation¹⁰. OA synovial membranes were then incubated in the presence or absence of inhibitors of either the COX or LOX pathways in HB-DMEM, containing 0.5% FBS and antibiotics, during a period of either 72 hours (eicosanoids and IL-1 β measurements) or 24-72 hours (RNA analysis). For eicosanoid measurements, ionomycin (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA), at a final concentration of 20 nM, was added 24 hours before the end of incubation.

The effects of drugs acting at different levels of the arachidonic pathway [naproxen (Sigma), rofecoxib, NS398 (Calbiochem), licofelone (Merckle GmbH), nordihydro-guaiaretic acid (NDGA, Cayman Chemical) and FR 122047 (Tocris)] were investigated. Indeed, naproxen is an inhibitor of both COX-1 and COX-2, while rofecoxib and NS398 are COX-2 specific inhibitors. Licofelone blocks COX-1 and COX-2 but also 5-LOX. NDGA is a broad inhibitor of 5-LOX, 12-LOX and 15-LOX. FR 122047 is a COX-1 specific inhibitor.

Eicosanoids and IL-1 β measurements

Measurements of PGE₂, LTB₄, (EIA, Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA), lipoxin A₄ (EIA, Lexington, KY, USA), and IL-1 β (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in conditioned medium were performed according to the manufacturers' instructions.

Quantitative PCR

RNA extraction. Osteoarthritic synovial membranes were homogenized in Trizol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and total RNAs were extracted with some modifications, according to a previously described protocol²⁵. Briefly, a first centrifugation was done before the addition of chloroform to eliminate debris. Then, the supernatant was mixed with chloroform, cooled at 4°C for 5 min, and centrifuged (12,000g, 10 min at 4°C). The aqueous phase was transferred to a new tube and precipitated with one volume of isopropyl alcohol overnight at -20°C. After centrifugation (12,000g, 15 min at 4°C), the pellet was suspended in water. RNA was quantitated by RiboGreen[®] RNA quantitation reagent (Molecular Probe, Eugene, OR, USA).

RT-PCR. Two µg of total RNA were used in the RT-PCR reaction. The assay was carried out in a Gene ATAQ controller (Amersham Pharmacia Biotech, Bale d'Urfé, QC, Canada). The RNA was converted into a single stranded DNA with 50 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) in 20 µl of reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM of each dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 2.5 µM random hexamers (Amersham Pharmacia Biotech), and 20 units RNA inhibitor. The mixture was incubated at 42°C for 45 min and at 99°C for 5 min. Real-time PCR on a Gene Amp 5700 Sequence Detector System (Applied BioSystems, Foster City, CA) was performed in a total volume of 50 µl in the presence of 100 ng of cDNA (samples, external standards or water). MgCl₂ was added to a final concentration of 2 mM, each oligonucleotide primer added to a final concentration of 100 nM and the SYBR[®] Green core reagents added according to the manufacturer's instructions (Applied BioSystems). To avoid sample contamination from previous amplifications, an initial step with AmpErase UNG was performed for 2 min at 50°C followed by an AmpErase inactivation (10 min at 95°C). PCR was performed with an initial step for 5 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. We verified that a single peak was obtained for each product

using the Gene Amp 5700 Sequence Detector System software. PCR primers for 5-LOX were sense 5'-CTGTTCTGGGCATGTACCC and antisense 5'-GACATCTATCAGTGGTCGTG. These primers produced a 467 bp amplified fragment. Specific primers for FLAP were sense 5'TCTACTGCCAACCAGAAC and antisense 5'-ACGGACATGAGGAACAGG, which gave a 223 bp amplified fragment. For GAPDH, used as a housekeeper gene, the sense primer was 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT, which corresponded to the position 604-624 bp; the antisense primer was 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG and corresponded to the position 901-922 of the published sequence 26 Primers were synthesized by Medicorp (Montreal, QC, Canada).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney tests were performed to assess differences between groups with results of $p < 0.05$ considered significant.

RESULTS

Previously, it was shown that synovial explants produced LTB₄, which could subsequently regulate both IL-1 β and TNF production^{10,27}. As cytokines, particularly IL-1 β , are important for the development of OA, we investigated whether NSAIDs could regulate synovial membrane-produced LTB₄. Among the different drugs tested, only naproxen induced a dose-dependent increase in the production of LTB₄ under unstimulated conditions reaching a 5-fold increase. None of the other drugs changed the basal levels of LTB₄ (figure 1A). Moreover, incubation of synovial membranes with either 1 μ M of rofecoxib (COX-2 specific inhibitor) or with 1 μ M of FR 122047 (COX-I specific inhibitor) did not modulate LTB₄ production under the same experimental conditions (data not shown). The apparent inefficacy of licofelone or NDGA at reducing the level of LTB₄ in the absence of naproxen could be explained by the extremely small amount of LTB₄ produced under unstimulated conditions. Indeed, the amounts found in the basal levels in the absence of naproxen were very close to the limit of detection of the assay. However, upon stimulation by LPS (1 μ g/ml), LTB₄ production in explants was greatly stimulated and both licofelone and NDGA inhibited the LPS-stimulated LTB₄ production demonstrating the 5-LOX inhibitory activity of these compounds using our system (figure 2A). Under stimulated conditions, naproxen did not enhance LTB₄ production. Under both basal and LPS-stimulated conditions, all NSAIDs inhibited PGE₂ production while NDGA had no effect (figure 1B and figure 2B). On the other hand, NS398 had no effect on LPS-stimulated LTB₄ production (figure 2A).

As naproxen is a potent COX inhibitor, our results also suggested that PGE₂ could possibly regulate LTB₄ production. To investigate this hypothesis, naproxen-treated synovial membranes were incubated with exogenous PGE₂ (1 nM - 100 nM). Data showed that PGE₂ could partially inhibit the naproxen-induced increase of LTB₄ production. A PGE₂ concentration as low as 1 nM was effective and statistically

significant, and a maximum of 50% of inhibition was reached with 10 nM of PGE₂ (figure 3).

Furthermore, we investigated whether naproxen and PGE₂ modified the expression of 5-LOX and FLAP, the two enzymes involved in LTB₄ production. These experiments were performed using real-time PCR, and the expression of 5-LOX and FLAP was measured at 24, 48 or 72 hours. No variation from baseline in the expression of either 5-LOX or FLAP messengers was noticed when synovial membranes were treated with naproxen alone or in combination with PGE₂ (data not shown).

Other LOX products such as LXs have been demonstrated to have anti-inflammatory properties^{16 22}. Lipoxin A₄ has been shown to be implicated in the resolution of inflammation²⁸. Therefore, the following experiments were conducted to evaluate whether the shunt of AA to the LOX pathway might have an impact on the production of LXA₄. Under unstimulated conditions, naproxen, at a concentration, which strongly stimulated LTB₄ production (90 µg/ml), had no effect on LXA₄ levels (figure 4A). In contrast, licofelone strongly inhibited LXA₄ synthesis. Under LPS stimulation, LXA₄ production was downregulated with naproxen and licofelone (figure 4B). When we calculated the LTB₄/LXA₄ ratio under either unstimulated (figure 5A) or LPS-stimulated (figure 5B) conditions, our results showed an increase of this ratio with naproxen, which would favor the inflammatory process. For its part, licofelone kept the LTB₄/LXA₄ ratio to the control level.

As LTB₄ was previously shown to stimulate cytokine synthesis, we investigated whether naproxen could upregulate IL-1β synthesis. Under unstimulated conditions, no increase in IL-1β synthesis was noticed (data not shown). However, under LPS-stimulated conditions, both naproxen concentrations induced an overproduction of IL-1β whereas licofelone had no effect (figure 6).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated the capacity of NSAIDs that inhibit both COX-1 and COX-2 to induce a shunt of AA from the COX to the LOX pathway in OA synovial membranes. This shunting phenomenon was associated with an upregulation in IL-1 β synthesis. The regulation of this shunt may be at the post-transcriptional or posttransductional level of 5-LOX and FLAP. The addition of exogenous PGE₂ significantly reversed the naproxen effect. By contrast, specific COX-2 inhibitors (rofecoxib, NS398) did not induce such a shunt. By using NDGA, a 5-, 12- and 15-LOX inhibitor, and measuring PGE₂ levels, we showed that a shunt of AA from the LOX to the COX pathway did not exist in synovial membranes. Moreover, treatment with naproxen increased the LTB₄/LXA₄ ratio, thus favoring the inflammation process. Unlike naproxen and as expected, licofelone, which is a dual inhibitor of COX and LOX pathways, decreased levels of PGE₂, LTB₄ and lipoxins and prevented the over-expression of IL-1 β under LPS stimulation.

The finding that LPS-stimulated synovial explants did not produce higher levels of LTB₄ in the presence of naproxen could likely be explained by the fact that maximum production was already achieved likely because of the limited amount of 5-LOX. As a matter of fact, both naproxen and LPS induced a 5-fold increase of LTB₄ production under the present study's experimental conditions. 5-LOX produced LTA₄, which in return covalently binds and dose dependently inactivates 5-LOX. It has been estimated that each enzyme can catalyze approximately 500 reactions before becoming inactive^{29 30}. The naproxen-induced LTB₄ production was regulated at the post-transcriptional level since neither 5-LOX nor FLAP mRNA levels were modulated. In general, the regulation of 5-LOX and FLAP genes appears similar, reflecting the dual requirement for LTB₄ production³¹. However, exceptions to this coordinated expression exist. For example, differentiation of HL-60 cells into granulocyte-like cells with DMSO results in a concurrent increase in 5-LOX and FLAP mRNA, while differentiation with phorbol esters toward a macrophage-like

cell line results in an increase of FLAP but not in 5-LOX³². From our model, it can be hypothesized that 5-LOX and FLAP messengers might be regulated at a post-transcriptional level. Indeed, 5-LOX expression is complex and also involves control mechanisms for mRNA stability, mRNA translation, enzyme translocation, substrate availability, co-factor availability and enzyme activation³³. Moreover, LTB₄ synthase, another enzyme involved in LTB₄ production, could also be regulated. The presence of several different cell types in the synovial membrane increases the difficulty to discover precisely which enzyme and which level of regulation were clearly involved. These several possibilities raise a complex question, which is currently under investigation in our laboratory.

PGE₂ was found to partially downregulate the naproxen-induced LTB₄ production. It is important to note that the PGE₂ concentration found in the OA synovium was 0.5 to 3 μM and therefore, the exogenous concentrations of PGE₂ added were still below the pathological concentrations. The PGE₂ effect might occur through the inhibition of 5-LOX activity. Levy et al²⁸ recently showed that PGE₂ inhibited LTB₄ production in human polymorphonuclear cells (PMN), and that this production could be rescued with the addition of LTA₄ indicating that the inhibition of LTB₄ biosynthesis by PGE₂ occurred via 5-LOX inactivation. They also demonstrated that the inhibition did not result from inactivation of either cytosolic phospholipase A₂ or LTA₄ hydrolase²⁸. Nevertheless, it seems likely that another pathway, not yet identified, regulating LTB₄ production may exist in our synovial explant culture model under treatment with naproxen. Among different possibilities, one could suggest that naproxen acts via the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) system. Since PPAR-γ isoform is very sensitive to activation by naproxen (10 μM or 2.5 μg/ml)³⁴, the concentration of the drug used in the present study could have activated PPAR-γ.

The results obtained with NS398 in the present study are in certain aspects similar and in other aspects different from previous reports. On one hand, NS398

under LPS stimulation confirms the findings of an absence in decrease in LTB₄ production as described by He et al.¹⁰ On the other hand, NS398 did not induce the shunt which was previously reported in osteoblasts²³. The latter results may be explained by a differential role played by the different COXs. Studies on COX-2 specific inhibitors have shown that COX-2 activity is of the utmost importance in the homeostasis of bone under normal conditions^{35 36}. Furthermore, throughout the present study we could not demonstrate a shunt in the presence of a COX-1 specific inhibitor alone (FR 122047). These results support the concept that only a complete suppression of PGE₂ production by a dual inhibition of COXs with naproxen treatment could induce the shunt. This is supported by the experiments showing that even very low concentration of exogenous PGE₂ (1 - 10 nM) could reverse at least partially the shunt. This finding also corroborates the important role played by COX-1 activity in regulating the AA pool in synovial membranes under unstimulated conditions.

Conversion into LXs, and more particularly into LXA₄ and LXB₄ in mammals is another metabolic route for AA. Lipoxins are generated during cell-cell interactions and serve as braking signals of inflammation^{21 37}. In this study, we showed that under basal conditions, naproxen had no effect on LXA₄ production. In contrast, naproxen inhibited the LPS-induced LXA₄ production suggesting an obvious differential regulation of LXA₄ under both basal and stimulated conditions. Indeed, it is well known that LPS activates numerous intracellular signaling routes that could be PGE₂ dependent. Although speculative, one might suggest that under LPS-stimulated conditions, the increase of LXA₄ production was related to an upregulation of the 15-LOX expression by PGE₂, as demonstrated by Levy et al.²⁸. This finding is also supported by the experiments showing that LXA₄ production was also inhibited by NS398 under these conditions. Perhaps the most relevant fact was that the LTB₄/LXA₄ ratio increased with naproxen, an increase that could cause an imbalance in the response of cells to each component. This imbalance is of particular importance in joint diseases, since LXA₄ was previously shown to inhibit IL-1 β -induced IL-6, IL-

8 and metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhance synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases³⁸. In summary, it could be hypothesized that in the absence of inflammation, the intake of naproxen may lead to an overproduction of LTB₄, which would induce in a chronic basis an inflammatory process in the joint (figure 7). In the presence of inflammation, the intake of naproxen would downregulate the LXA₄ production and increase the LTB₄/LXA₄ ratio, which would create an environment favorable to creating a pro-inflammatory condition.

Previous studies have shown that LTB₄ can modulate the synthesis of IL-1 β in synovial explants^{10 19 39}. It was therefore most relevant to investigate whether or not the upregulation of LTB₄ induced by naproxen had an impact on the level of IL-1 β synthesis. In fact, IL-1 β synthesis increased only by co-incubating naproxen and LPS. There are several possible explanations for these results. First, in our culture system, LTB₄ production was approximately 10 to 30 pM with either naproxen or LPS stimulation, which concurs with the concept that LTA₄ limits 5-LOX activity^{29 30}. This level is however 10 to 100 times lower than that found by He et al¹⁰. The difference could be due to the ionophores used. Indeed, we chose to use only ionomycin whereas the study of He et al used the combination of ionomycin and thapsigargin¹⁰, a combination which may have mobilized a higher level of intracellular Ca²⁺ and activated both nuclear and cytosolic 5-LOX, since 5-LOX has been described in cytosol and nuclei. It is possible that ionomycin alone induced only the activity of the cytosolic 5-LOX³³. Nevertheless, the level of LTB₄ production found in the present study is in agreement with that previously found in arthritic synovial fluids^{40 41}. Therefore, although two preceding studies have shown that LTB₄ can induce the synthesis of IL-1 β ^{10 39}, the concentrations used were high (10⁻⁹ and 10⁻⁸ M) and could have recruited other signaling pathways also present when the synovium was stimulated with LPS. On the other hand, IL-1 production could be regulated at the transcriptional, post-transcriptional (mRNA stability), translational and post-translational (protein maturation) level. Under unstimulated conditions, LTB₄ alone could not stimulate IL-1 synthesis. In contrast under LPS stimulation,

which mimics inflammatory conditions and activates numerous signaling pathways, LTB₄ acts as a cofactor of one of these pathways, hence enhancing IL-1 production. It is not the first time that eicosanoids such as LTB₄ have been demonstrated to have differential effects under basal and stimulated conditions. Faour et al showed that PGE₂ and LTB₄ can reverse NS398-dependent inhibition of IL-1 β -induced COX-2 expression but have no effect in quiescent unstimulated synovial fibroblasts⁴². Another aspect of LPS stimulation was demonstrated by Jiang et al who argued that the LPS stimulation pathway may overcome the PPAR- γ pathway in OA synovial membranes⁴³. Overall, as the main difference between the effect of naproxen and licofelone relate to the capacity of inhibiting LTB₄ production, these findings suggest that under the actual experimental conditions, LTB₄ is an important cofactor in the synthesis of IL-1 β in OA synovium.

In summary, this study shows that the COX pathways generally metabolize AA in OA synovial explants. However, in certain circumstances of PGE₂ depletion provoked by drugs that inhibit both COX-1 and COX-2 enzymes, a shunt occurs from the COX to the LOX pathway. This phenomenon induces an excess production of LTB₄ as well as an increase in the ratio of LTB₄/LXA₄ and leads to an increased production of IL-1 β , a cytokine known to play a major role in the pathophysiology of OA. By controlling simultaneously both PGE₂ and LTB₄ production, licofelone is an interesting new drug, which may present advantages for the treatment of OA treatment because of its capacity to inhibit this shunt.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Lorraine Doré, Santa Fiori and Julie Francoeur for their assistance in manuscript preparation. This study was supported in part by a grant from Merkle GmbH (Ulm, Germany) and by la Chaire en Arthrose from the University of Montreal. Patrick Marcouiller is a recipient of the Fonds Marthe-Demers en g erontologie-g eriatric from the University of Montreal. Pascal Reboul is a recipient of Dr. Andr e Lanthier Scholarship from the University of Montreal.

REFERENCES

1. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis, In Koopman WJ, ed. *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology* Baltimore: Williams & Wilkins, 2001:2195-2245.
2. Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthrosis The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. *J Anat.* 1994;184:477-492.
3. Hamerman D. The biology of osteoarthritis *N Engl J Med.* 1989;320:1322-1330.
4. Recklies AD, Poole AR, Banerjee S, Bogoch E, Di Battista JA, Evans C Heal. Pathophysiologic aspects of inflammation in diarthroidal joints, In Buckwalter JA ETSS, ed. *Orthopaedic Basic Science. Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System.* Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000:489-530
5. Brennan FM, Chantry D, Jackson AM, Maini RN, Feldmann M: Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane. *J Autoimmun* 1989;2 Suppl:177-186.
6. Elson CJ, Mortuza FY, Ferry MJ, Warnock MG, Webb GR, Westacott CI: Cytokines and focal loss of cartilage in osteoarthritis *Br J Rheumatol* 1998;37:106-107
7. Martel-Pelletier J, Mineau F, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Pelletier JP. *In vitro* effects of diacerhein and rhein on IL-1 and TNF- α systems in human osteoarthritic tissues. *J Rheumatol.* 1998;25:753-762.

8. Wittenberg RH, Willburger RE, Kleemeyer KS, Peskar BA. *In vitro* release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1444-1450.
9. Moilanen E, Alanko J, Nissila M, Hamalainen M, Isomaki H, Vapaatalo H. Eicosanoid production in rheumatoid synovitis. *Agents Actions.* 1989;28:290-297.
10. He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA. The synthesis of interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human OA synovial membrane explants: Interactions with antiinflammatory cytokines. *J Rheumatol.* 2002;29:546-553.
11. Musser JH, Kreft AF. 5-lipoxygenase: properties, pharmacology, and the quinoliny(bridged)aryl class of inhibitors. *J Med Chem.* 1992;35:2501-2524.
12. Laufer SA, Augustin J, Dannhardt G, Kiefer W. (6,7 -Diaryldihydropyrrolizin-5 yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Med Chem.* 1994;37:1894-1897.
13. Laufer S, Tries S, Augustin J, Dannhardt G. Pharmacological profile of a new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneimittelforschung.* 1994;44:629-636.
14. Sala A, Zarini S, Bolla M. Leukotrienes: lipid bioeffectors of inflammatory reactions. *Biochemistry(Mosc).* 1998;63:84-92.
15. Bray MA, Ford-Hutchinson AW, Smith MJ. Leukotriene B₄: an inflammatory mediator in vivo. *Prostaglandins.* 1981;22:213-222.

16. Funk CD: Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-1875.
17. Radmark OP. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:S11-15.
18. Penrose JF, Austen KF, Lam BK. Leukotrienes: biosynthetic pathways, release and receptor-mediated actions with relevance to disease states, In Anonymous *Gallin JL, Snyderman R. Editors. Inflammation basic principles and clinical correlates.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999:361-372.
19. Rainsford KD, Ying C, Smith F. Effects of 5-lipoxygenase inhibitors on interleukin production by human synovial tissues in organ culture: comparison with interleukin-1-synthesis inhibitors. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48:46-52.
20. Serhan CN, Levy ED, Clish CB, Gronert K, Chiang N. Lipoxins, aspirin-triggered 15-epi-lipoxin stable analogs and their receptors in anti-inflammation: a window for therapeutic opportunity. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2000;143-185.
21. Serhan CN. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins.* 1997;53:107-137.
22. Celotti F, Laufer S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res.* 2001;43:429-436.

23. Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Lajeunesse D. Study of role of leukotriene B₄ in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts. Effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum.* 2002;46: 1804-1812.
24. Altman RD, P;sch E, Bloch DA, Bole G, Borenstein D, Brandt KD, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 1986;29:1039-1049.
25. Tardif G, Di Battista JA, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J. Measurement of interleukin mRNA by Northern blotting using a non-radioactive detection method., In: O'Neill L, ed. *Interleukin Protocols*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc., 2000.
26. Martel-Pelletier J, Mineau F, Tardif G, Fernandes JC, Ranger P, Loose L, et al. Tenidap reduces the level of interleukin-1 receptors and collagenase expression in human arthritic synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 1996;23:24-31.
27. Bonnet C, Bertin P, Cook-Moreau J, Chable-Rabinovitch H, Treves R, Rigaud M. Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells. *Prostaglandins.* 1995;50: 127-135.
28. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001;2:612-619. 29.
29. Schewe T, Kuhn H, Rapoport SM: Positional specificity of lipoxygenases and their suitability for testing potential drugs. *Prostaglandins Leukot Med* 1986;23:155-160

30. Router CA, Samuelsson B: Leukocyte arachidonate 5-lipoxygenase: isolation and characterization. *Methods Enzymol* 1990;187:312-319.
31. Reid GK, Kargman S, Vickers PJ, et al: Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J Biol Chem* 1990;265:19818-19823.
32. Bennett CF, Chiang MY, Monia BP, Crooke ST: Regulation of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein expression in HL-60 cells. *Biochem J* 1993;289 (Pt 1):33-39.
33. Silverman ES, Drazen JM. The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111:525-536.
34. Jaradat MS, Wongsud B, phomchirasilp S, et al: Activation of peroxisome proliferators-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1587-1595.
35. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase2 regulates mesenchymal celldifferentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest*. 2002;109:1405-1415.
36. Zhang X, Morham SG, Langenbach R, Young DA, Xing L, Boyce BF, et al. Evidence for a direct role of cyclo-oxygenase 2 in implant wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res*. 2001;16:660-670
37. Brady HR, Serhan CN: Lipoxins: putative braking signals in host defense, inflammation and hypersensitivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5:20-27.

38. Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. Lipoxin A₄ inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases J Immunol. 2000;164:2660-2666.
39. Kageyama Y, Koide Y, Miyamoto S, Yoshida TO, Tnoue T. Leukotrien B₄-induced interleukin-1 β in synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 1994;23:148-150
40. Atik OS. Leukotriene B₄ and prostaglandin E₂-like activity in synovial fluid in osteoarthritis Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1990;39:253-354
41. Prete PE, Gurakar-Osborne A: The contribution of synovial fluid lipoproteins to the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. Prostaglandins 1997;54:689-698 42.
42. Faour W, He Y, de Ladurantaye M, He W, Quintero M, Mancini Ael. Prostaglandin E₂ regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1beta treated synovial fibroblasts. J Biol Chem. 2001;276:31720-3173 i.
43. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature. 1998;391:82-86.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Production of LTB₄ (1A) and PGE₂ (1B) by human OA synovial membrane explants under unstimulated conditions, incubated for 72 hours at 37°C in the absence (control) or presence of different NSALDs (naproxen, a COX-1 and COX-2 inhibitor; licofelone, a COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitor; NS398, a COX-2 specific inhibitor and NDGA, a 5-LOX, 12-LOX and 15-LOX inhibitor). LTB₄ data were normalized to naproxen (90 µg/ml) whereas PGE₂ data were normalized to control. Values are the mean ± SEM from 6-8 independent experiments.

Figure 2: Production of LTB₄ (2A) and PGE₂ (2B) by human OA synovial membrane explants which were incubated for 72 hours at 37°C in the absence (-) or presence (+) of LPS (1 µg/ml). See figure 1 for experimental conditions. LTB₄ data were normalized to LPS stimulation (LPS +) whereas PGE₂ data were normalized to control. Values are the mean ± SEM from 3-6 independent experiments.

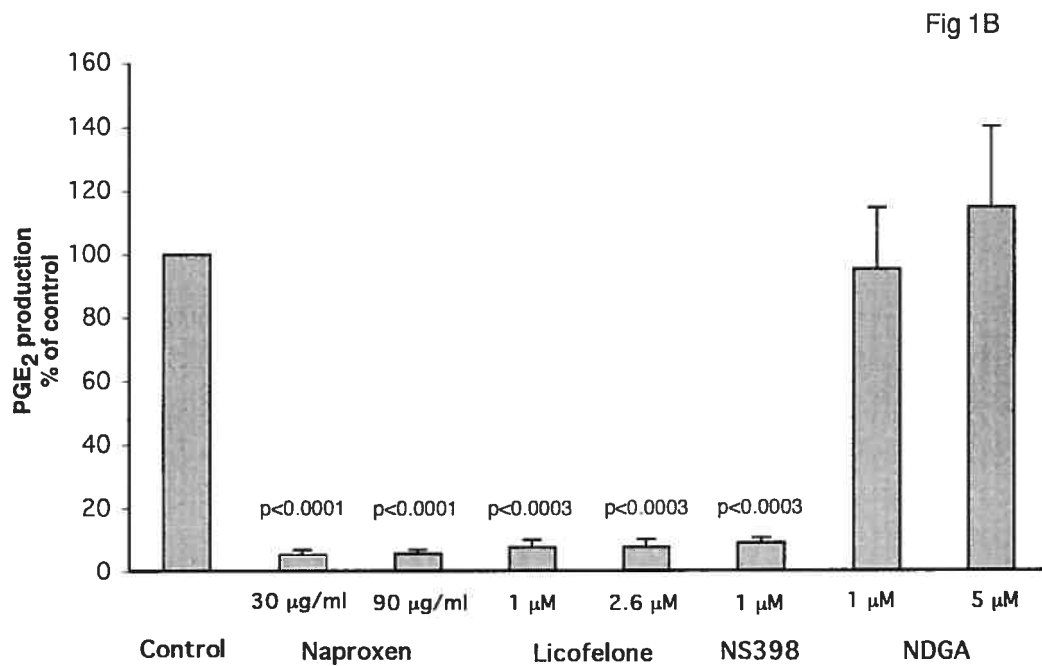
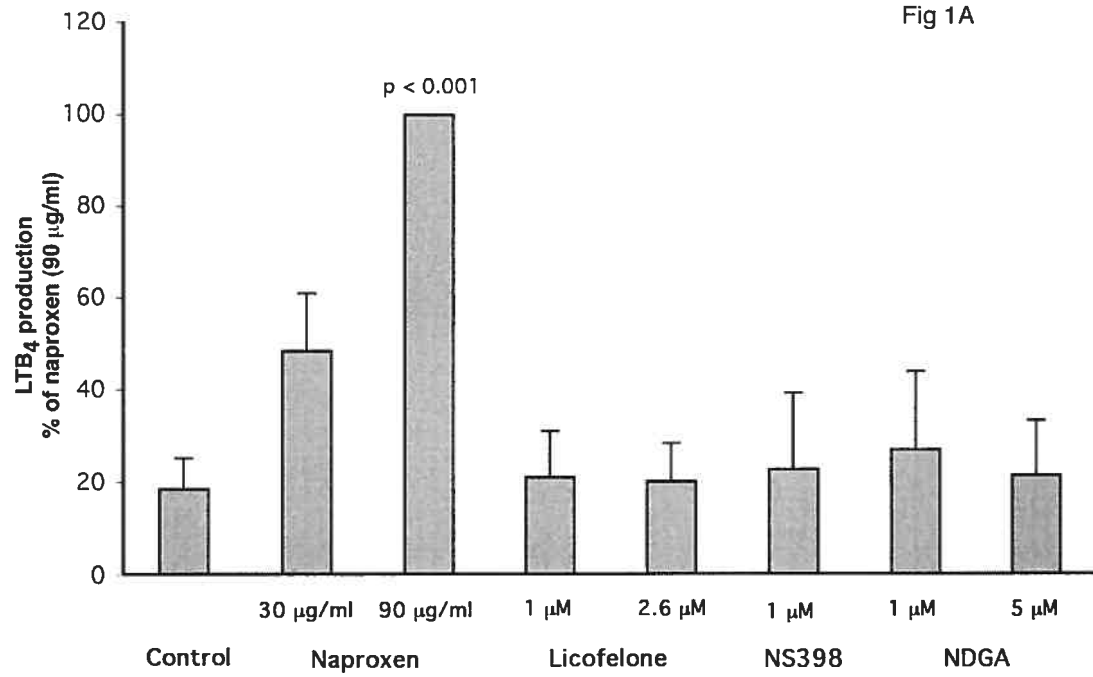
Figure 3: Reversibility on naproxen-induced LTB₄ production by PGE₂. Explants were incubated for 72 hours at 37°C in the absence (-) or presence (+) of naproxen (90 µg/ml) in combination with various concentrations of PGE₂ (1-100 nM). Results were normalized to naproxen-induced release of LTB₄. Values are the mean ± SEM from 4-6 independent experiments.

Figure 4: Production of LXA₄ by human OA synovial membrane explants under unstimulated (4A) or LPS-stimulated conditions (4B). Explants were incubated for 72 hours at 37°C in the absence (-) or presence (+) of LPS (1 µg/ml). Results were normalized to the control (4A) or to LPS stimulation (LPS +) (5B). Values are the mean ± SEM from 4-6 independent experiments.

Figure 5: Ratio of LTB₄/LXA₄ production by human OA synovial membrane explants under unstimulated (5A) or LPS-stimulated conditions (5B). Explants were incubated for 72 hours at 37°C in the absence (-) of LPS (1 µg/ml) or co-incubated with LPS (+) and either naproxen or licofelone. Values are the mean ± SEM from 4-5 independent experiments.

Figure 6: Production of IL-1β by human OA synovial membrane explants under LPS-stimulated conditions (4B). Explants were incubated for 72 hours at 37°C in the absence (-) of LPS (1 µg/ml) or co-incubated with LPS (+) and either naproxen or licofelone. Results were normalized to LPS stimulation (LPS +). Values are the mean ± SEM from 3-6 independent experiments.

Figure 7: Schematic representation of arachidonic acid (AA) shunt in the presence of naproxen. In the absence of naproxen, free AA is mainly used by the COX pathway. Conversely, by inhibiting the COXs and by an unidentified pathway, naproxen directs free AA to the LOX pathway.



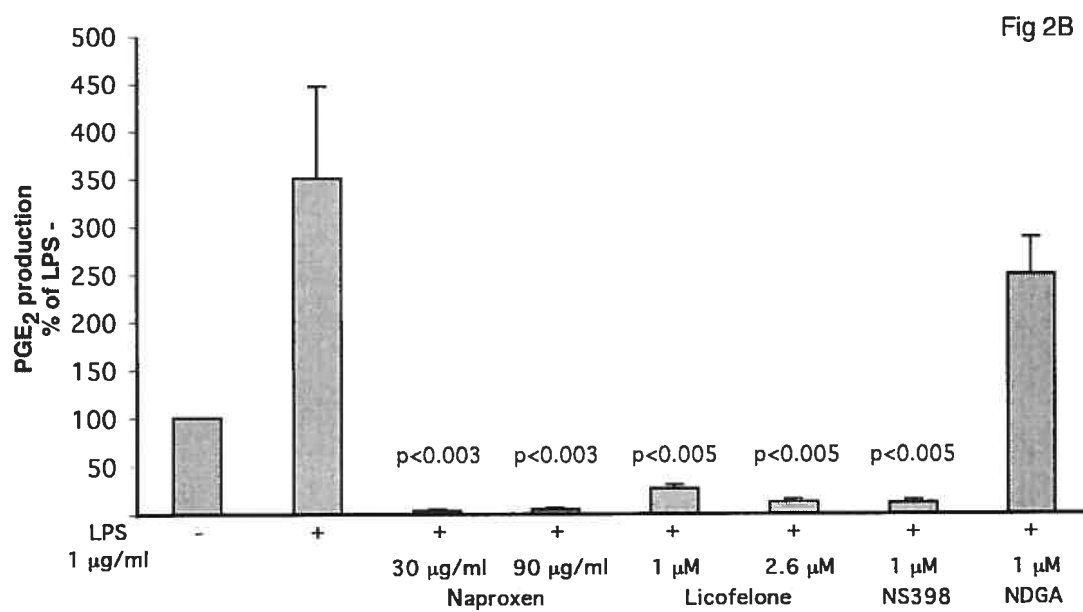
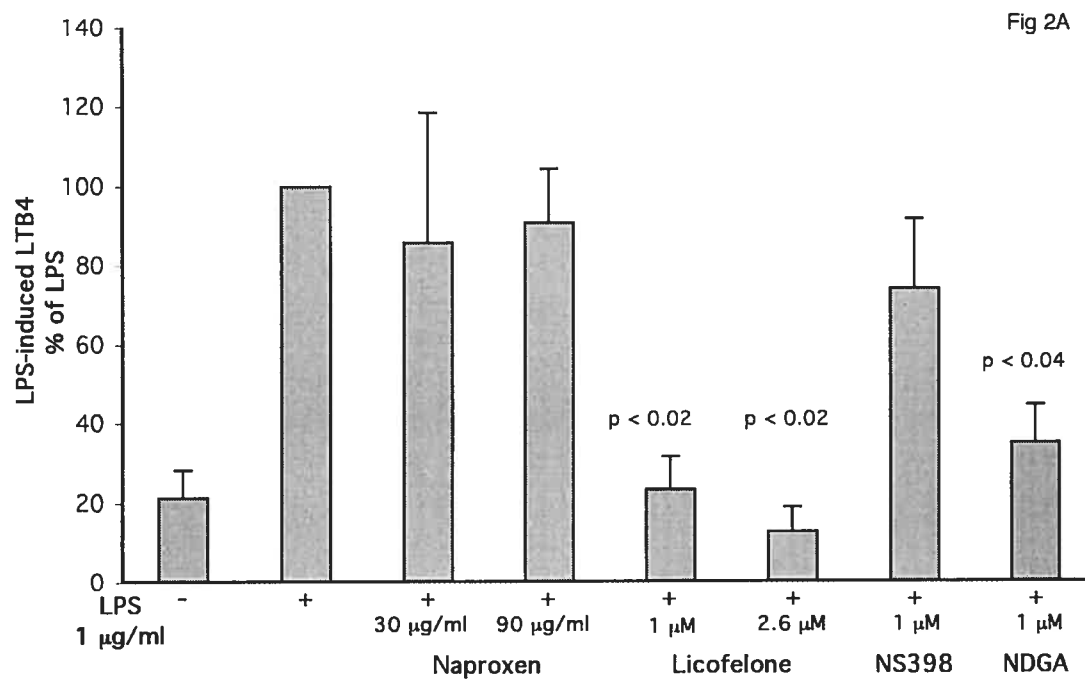


Fig 3

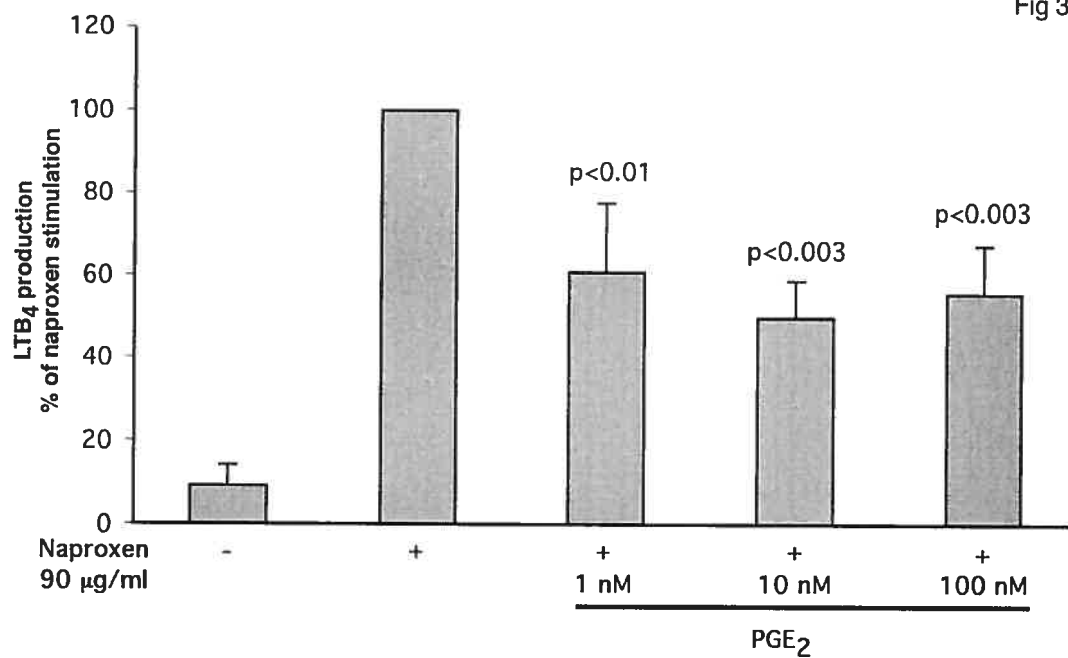
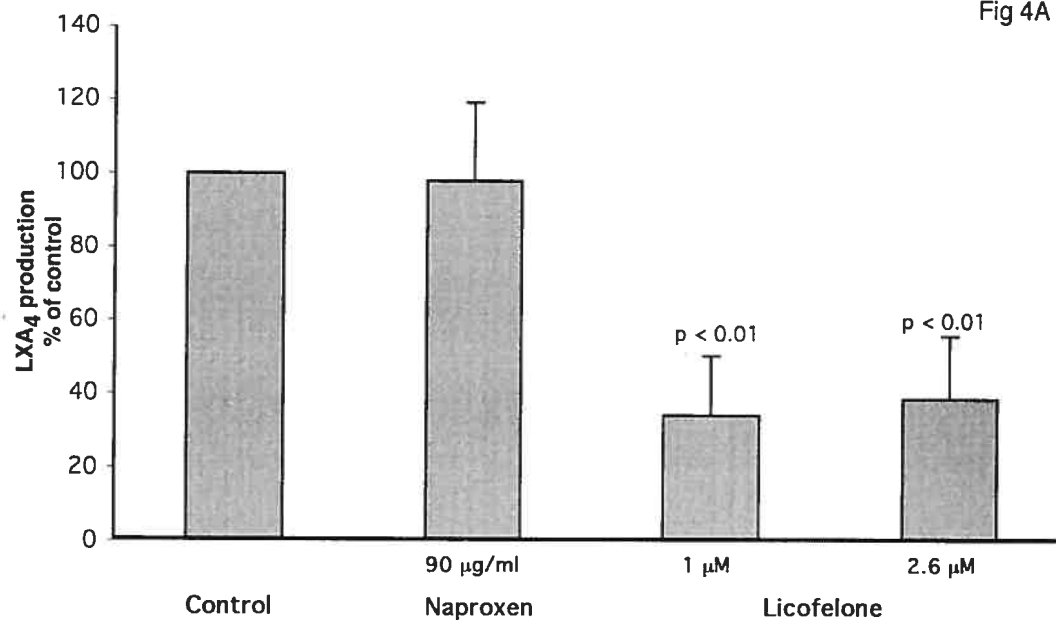
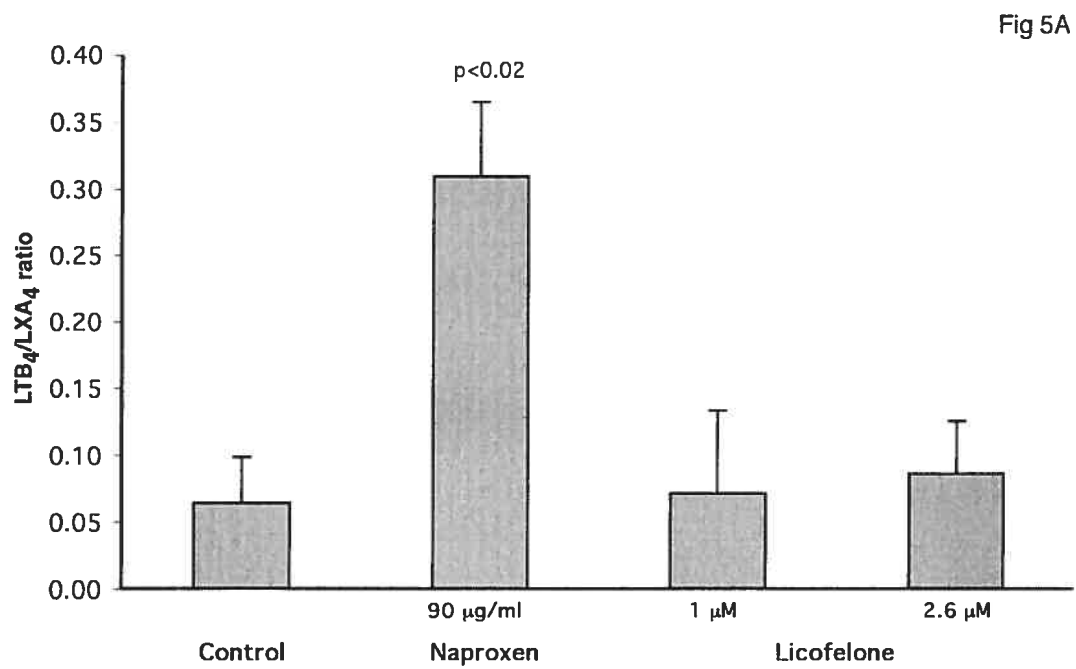
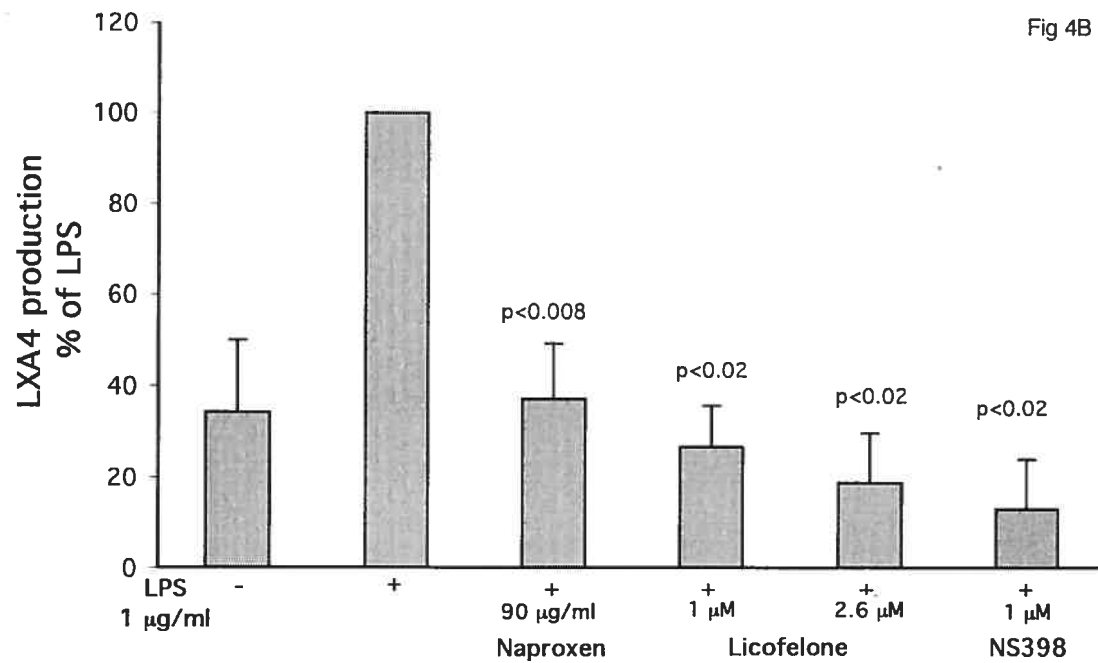


Fig 4A





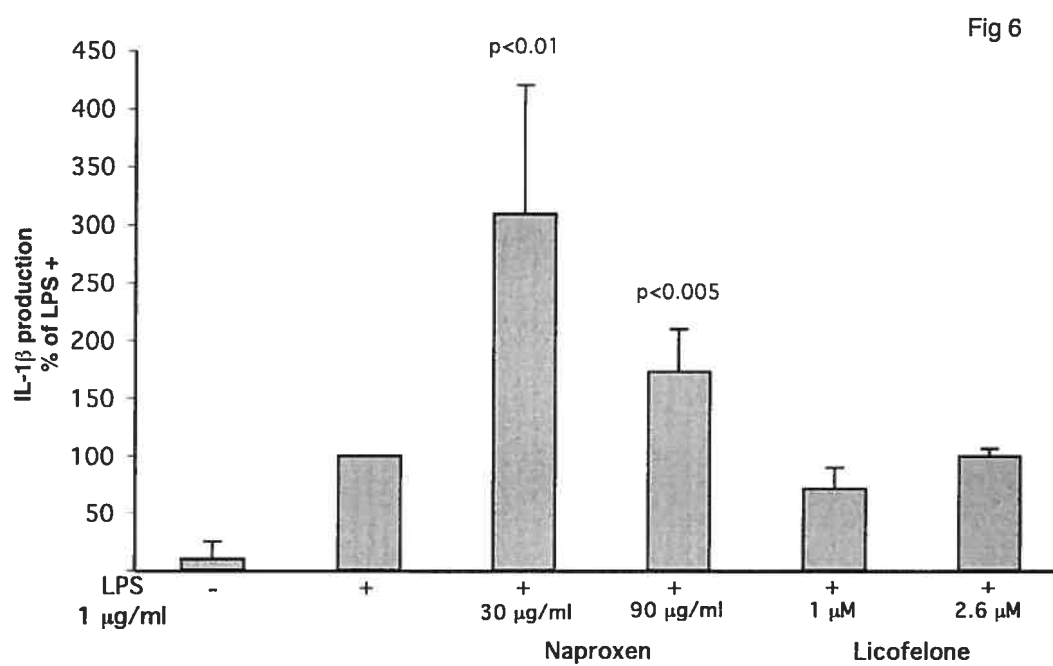
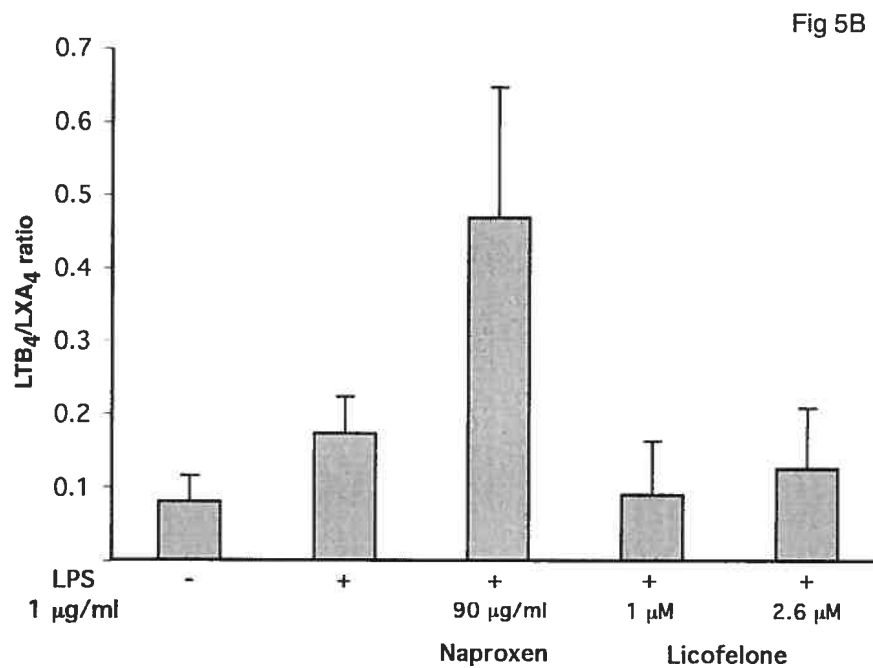
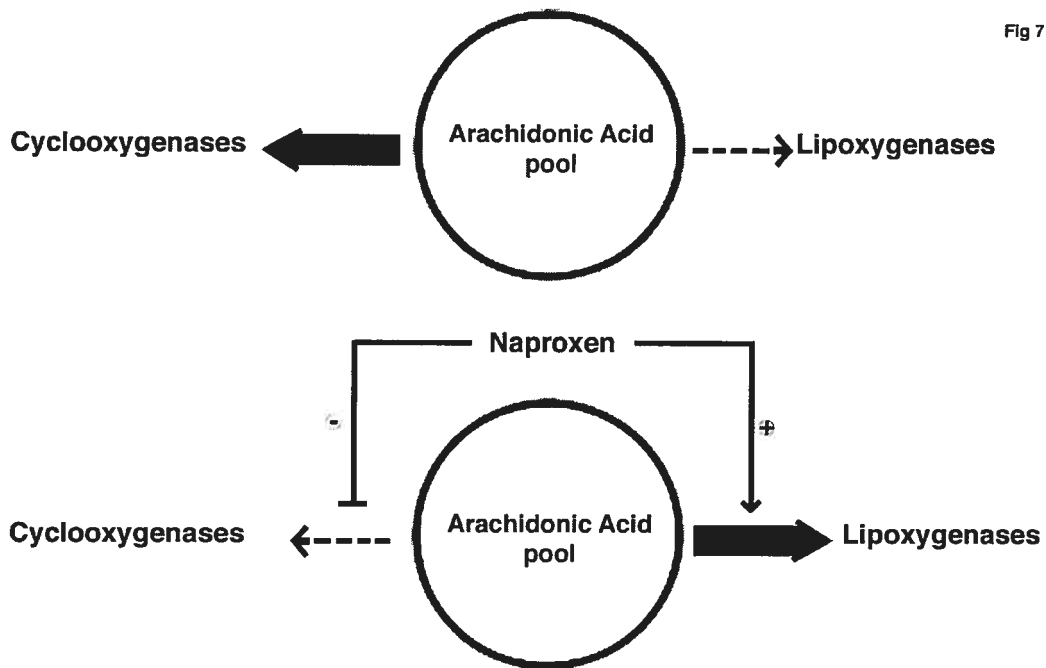


Fig 7



DISCUSSION

AINS ET MÉTABOLISME DES PGE₂

Notre étude a démontré que les AINS (naproxen), le NS-398 (inhibiteur spécifique de COX-2), les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (Vioxx) et les inhibiteurs mixtes (Licofelone) sont effectivement en mesure d'inhiber la synthèse des PGE₂ dans les membranes synoviales arthrosiques humaines. En effet, une forte inhibition a été notée tant dans les conditions basales que dans les conditions stimulées (en présence de LPS). En regardant du côté de l'expression de la COX-2, nous voyons une augmentation de celle-ci en présence de LPS ce qui confirme le fait que la COX-2 soit inductible. De plus, comme il a été décrit dans la littérature, l'ajout de NS-398 dans des conditions stimulées fait en sorte de diminuer l'expression de la COX-2 (Di Battista et *al.*, 2001). Cependant, il est intéressant de constater que la Licofelone, à une concentration de 1 μ M, est en mesure d'inhiber encore plus efficacement l'expression de la COX-2. Puisque que cette molécule bloque la synthèse de LTB₄, ceci nous laisse croire que les LTB₄ joueraient un rôle dans la régulation de l'expression de la COX-2.

MÉTABOLISME DU LTB₄ ET SHUNT

La production de LTB₄ dans notre modèle expérimental se situe entre 10 pM et 30 pM en présence de naproxen ou de LPS. Ce niveau de production est toutefois 10 à 100 fois moins élevé que celui trouvé par He et *al* (2002). Cette différence pourrait s'expliquer par le type d'ionophore utilisé pour faire entrer le calcium dans les cellules. Dans notre étude, nous avons utilisé la ionomycine tandis que He et *al.* (2002) ont utilisé la ionomycine en combinaison avec la thapsigargin. Ceci aurait pu avoir comme effet d'augmenter d'avantage la quantité de Ca²⁺ ayant pu entrer dans les cellules, activant ainsi à la fois les 5-LO nucléaires et cytosoliques. Il se peut que

la ionomycine seule puisse seulement activer la 5-LO cytosolique (Silverman et Drazen, 1999). Cependant, les concentrations de LTB₄ retrouvées dans notre étude sont proches de celles retrouvées dans le liquide synovial arthrosique (Atik, 1990; Prete et Gurakar-Osborne, 1997).

Dans les conditions non-stimulées, la synthèse de LTB₄ ne semble pas être affectée ni par la Licofelone, ni par le NS-398. Il en est de même pour le NDGA (inhibiteur des LOs). Il est normal d'obtenir ce résultat pour le NS-398 puisqu'il est en mesure d'inhiber les COXs seulement (préférentiellement la COX-2). Cependant, qu'en est-il de la Licofelone et du NDGA? La faible quantité de LTB₄ au niveau basal serait responsable de ce phénomène. En effet, la quantité de LTB₄ se trouvait à la limite de détection de la trousse de dosage, rendant une diminution de concentration pratiquement invisible. Il y a également le fait que la courbe standard de la trousse de dosage est une sigmoïde dont l'extrémité des faibles concentrations s'arrête à 3.9 pg/mL. En effet, la courbe tend vers zéro, mais par définition, elle ne pourra jamais l'atteindre. Ceci fait en sorte que les concentrations de LTB₄ se situant entre 0 et 3.9 pg/mL seraient, en réalité, nulles. Il en est tout autrement avec le naproxen dans les mêmes conditions (non-stimulées). En effet, l'ajout du naproxen cause une augmentation remarquable de la synthèse de LTB₄. Ceci représenterait le phénomène de « shunt ». Donc, les PGE₂ seraient des candidates potentielles pour la régulation de la synthèse de LTB₄. Dans des conditions stimulées (en présence de LPS), la quantité de LTB₄ produite est plus importante et ceci nous permet de voir une inhibition efficace de la synthèse de LTB₄ par la Licofelone et le NDGA, soit une réduction de la synthèse de LTB₄ de 80% à 90% et d'environ 50% respectivement.

RÉVERSIBILITÉ DU SHUNT

Les résultats nous montrent que l'ajout de PGE₂ exogènes peut diminuer partiellement la synthèse de LTB₄ induite par le naproxen. En effets, de petites quantités de PGE₂ exogènes (1 à 10 nM) peuvent atténuer le « shunt ». Par le fait

même, ceci nous démontre la puissante régulation des PGE₂ sur la synthèse du LTB₄. Il est cependant important de noter que la concentration de PGE₂ retrouvée dans la MS non-stimulée en culture varie entre 0.5 µM et 3 µM. La concentration de PGE₂ exogène ajoutée se trouve donc toujours en-deça des concentrations retrouvées dans la pathologie. Ces niveaux élevés de PGE₂ retrouvés dans l'arthrose pourraient s'expliquer par une stimulation de la synthèse de ces médiateurs lipidiques par la cytokine IL-18 (Futani et al., 2002). Cette voie n'a toutefois pas été étudiée dans notre modèle expérimental. En temps normal (en absence d'inflammation), nous voyons que la MS produit très peu ou pas de LTB₄. En effet, c'est seulement avec l'abolition totale de la synthèse des PGE₂ (grâce au naproxen) qu'il est possible d'avoir une augmentation significative de la synthèse de LTB₄ en absence de stimulation.

Le mécanisme d'action des PGE₂ semble passer par l'inhibition de l'activité de la 5-LO. En effet, Levy et al. (2001) ont démontré que les PGE₂ pouvaient diminuer la production de LTB₄ dans les PMN humains. Cette diminution pouvait toutefois être levée en ajoutant du LTA₄, indiquant que l'inhibition de la synthèse des LTB₄ par les PGE₂ pouvait se faire par l'inactivation de la 5-LO. Il a également été démontré par le même groupe que cette inhibition n'est pas le résultat d'une inactivation de la PLA₂, ni de la LTB₄ synthase. Certaines études ont démontré que l'inhibition de la synthèse de LTB₄ par les PGE₂ pouvait passer par la cytokine IL-10. En effet, les PGE₂ sont en mesure d'activer l'IL-10 qui elle, inhibe la synthèse de LTB₄ (Harizi et al., 2003). Par conséquent, il aurait été intéressant d'étudier ce mécanisme dans la MS arthrosique humaine lors de notre étude. Si nous regardons du côté de la FLAP, nous voyons que cette dernière ne semble pas être très impliquée dans le « shunt ». En effet, nous n'avons vu aucune variation de son expression par PCR quantitatif. Il n'existe pratiquement pas de littérature à ce sujet et par conséquent, des études devraient se pencher sur cette protéine bien qu'elle ne soit pas limitante.

Toutefois, il semble y avoir une autre voie de régulation pour la synthèse de LTB_4 lorsque le naproxen est utilisé. Il est effectivement suggéré que le naproxen puisse agir via le « peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) system ». En effet, l'isoforme PPAR- γ peut être activée facilement par le naproxen ($10 \mu\text{M}$ ou $2,5 \mu\text{g/mL}$) (Jaradat et *al.*, 2001). Notons que la concentration de naproxen utilisée dans nos expériences ($90 \mu\text{g/mL}$) est semblable à la concentration retrouvée dans le fluide synovial d'un patient prenant 500 mg de naproxen deux fois par jour. Par conséquent, il serait possible que la concentration de naproxen utilisée lors de nos expériences ait pu activer l'isoforme PPAR- γ .

LE SHUNT ET SA RÉGULATION DANS DES CONDITIONS STIMULÉES

Nos recherches ont également démontré que le « shunt » induit par le naproxen n'était pas possible en présence de LPS. En effet, le LPS semble stimuler toutes les voies de synthèse de l'AA. Par conséquent, la production maximale serait déjà établie, rendant un « shunt » impossible. L'hypothèse de l'effet limitant de la PLA_2 peut être écartée dès le début car une stimulation par le LPS induit une augmentation de synthèse des PGE_2 et des LTB_4 , ce qui utilise tout l'AA. Par conséquent, une inhibition des COXs par le naproxen devrait rediriger l'AA vers la voie de la 5-LO et induire une augmentation de synthèse de LTB_4 . Toutefois, nos résultats nous montrent plutôt que la synthèse de LTB_4 en présence de LPS et de naproxen n'augmente pas. Ceci nous laisse croire que la 5-LO pourrait être limitante.

L'absence de « shunt » (dans les conditions stimulées) pourrait alors être due à la quantité limitée de 5-LO présente. Dans les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons travaillé, le naproxen et le LPS étaient en mesure d'augmenter de 5 fois la synthèse de LTB_4 . Ceci démontre la production de LTB_4 par la MS dans chacune des conditions (stimulée et non-stimulée), tel que démontré par He et *al.* (2002). Un fait pouvant expliquer la quantité limitée de 5-LO serait que le LTA_4 produit par cette enzyme peut se lier de façon covalente à cette dernière et l'inactiver.

Il a été également estimé que chaque enzyme peut catalyser près de 500 réactions avant d'être inactivée (Schewe et *al.*, 1986; Router et Samuelsson, 1990). D'après nos résultats, il semble que la synthèse de LTB₄ induite par le naproxen (dans la MS) soit régulée de façon post-transcriptionnelle et qu'elle ne dépende ni d'une variation de l'expression de la 5-LO, ni d'une variation de l'expression de la FLAP. Dans la littérature, il est mentionné qu'en général, ces deux protéines sont conjointement impliquées dans la synthèse de LTB₄ car en effet, leurs gènes sont habituellement régulés de façon similaire (Reid et *al.*, 1990). Dans notre modèle expérimental, il est possible que la 5-LO et la FLAP soient régulées de façon post-transcriptionnelle puisque les niveaux d'ARNm de ces enzymes n'ont pas été modifiés. L'expression de la 5-LO est complexe et implique des mécanismes de contrôle pour la stabilité de l'ARNm, la transcription, la translocation de l'enzyme, la disponibilité de l'AA, la disponibilité de la FLAP et l'activation de l'enzyme (Silverman et Drazen, 1999). De plus, dans notre modèle expérimental, la LTB₄ synthase pourrait également être régulée.

La nature multicellulaire de la MS rend la recherche de l'enzyme responsable et du niveau de contrôle est très compliquée. Il serait alors tentant de travailler avec une lignée cellulaire issue de la membrane synoviale. Cependant, la composition hétérogène de la MS et l'existence d'interactions entre les cellules de la MS ou avec les cellules infiltrantes rendent impossible une tentative comme celle-ci. Un exemple d'interaction entre les cellules serait la synthèse de LXA₄, phénomène dans lequel le LTA₄ produit par la 5-LO des PMN infiltrants est transformé en lipoxines par la 15-LO des cellules du tissu inflammé. Donc, travailler sur une lignée cellulaire ne serait pas représentatif de la MS en entier et encore moins représentatif des conditions *in vivo*.

Et si ce n'était pas le niveau d'expression de la 5-LO qui était responsable des fluctuations dans la synthèse de LTB₄. En effet, comme il a été mentionné, il est possible que la LTB₄ synthase soit régulée dans la synthèse de LTB₄. Il faudrait alors

vérifier le niveau de régulation réel de la LTB₄ synthase. Pour se faire, il faudrait inhiber totalement l'activité de la PLA₂ pour s'assurer qu'il n'y aura pas production d'AA. Ce n'est qu'à ce moment que nous pourrions voir la régulation de la LTB₄ synthase au niveau de son activité et de son expression. En ajoutant du LTA₄ exogène, nous pourrions mesurer l'activité de la LTB₄ synthase en effectuant un dosage des LTB₄ produits. De plus, il serait également approprié de vérifier l'effet des PGE₂ et des LTB₄ exogènes sur l'activité de la LTB₄ synthase. En utilisant la RT-PCR, il serait intéressant de voir si le LPS et les différents inhibiteurs qui ont servi au cours de nos expériences pourraient moduler l'expression de la LTB₄ synthase. Cependant, la nature instable du LTA₄ fait en sorte qu'il serait difficile de réaliser ces manipulations. Il serait alors possible de se tourner vers un composé analogue stabilisé afin de remplacer le LTA₄.

INHIBITION TOTALE DES COXS POUR AVOIR LE SHUNT

Un autre fait intéressant qu'il a été possible de voir avec nos résultats est que parmi les molécules inhibant les COXs, que nous avons utilisés pour nos expériences, seul le naproxen pouvait induire le « shunt ». Pour la Licofelone c'est logique car il inhibe également la voie de la 5-LO. Pour le NS-398, certains résultats sont semblables avec les études passées et d'autres sont différents. En effet, nos résultats ont démontré une absence de diminution dans la synthèse de LTB₄ dans des conditions stimulées (en présence de LPS) tout comme l'avait décrit He et *al.* (2002). Cependant, le NS-398 et le Vioxx n'ont pas été en mesure d'induire un « shunt » comme il a déjà été démontré dans les ostéoblastes (Paredes et *al.*, 2002). L'absence de « shunt » pourrait s'expliquer par les rôles différents qu'ont les deux isoformes de la COX. Les études sur les inhibiteurs spécifiques de la COX-2 ont démontré que l'activité de la COX-2 est d'une grande importance dans le maintien de l'homéostasie de l'os dans des conditions normales (Zhang et *al.*, 2001; Zhang et *al.*, 2002). De plus, le FR122047 (inhibiteur spécifique de la COX-1), n'a pas été en mesure d'induire un « shunt ». Ceci laisse sous-entendre que seule une inhibition complète de

la synthèse des PGE₂, en bloquant l'activité des deux isoformes de la COX à la fois, pourrait induire le « shunt ». Ceci est en accord avec le fait que des petites quantités de PGE₂ exogène (1 à 10 nM) peuvent atténuer le « shunt ». Par le fait même, ceci nous démontrerait la puissante régulation des PGE₂ dans la synthèse des LTB₄. Nos résultats viennent corroborer le rôle important joué par la COX-1 dans la régulation du stock d'AA dans la MS en absence de stimulation. Auparavant, l'emphase était plutôt portée sur la COX-2 étant donné son aspect inductible lors de l'inflammation. Un test supplémentaire pourrait démontrer hors de tout doute raisonnable le fait que l'inhibition totale des COXs est nécessaire pour avoir le « shunt ». En effet, en suivant notre hypothèse, la combinaison du FR122047 avec un inhibiteur spécifique de la COX-2 (NS-398 ou le Vioxx) devrait théoriquement avoir le même effet que le naproxen, soit induire le « shunt ». Ceci permettrait également d'éliminer l'hypothèse faisant intervenir un mécanisme PPAR- γ dépendant.

LE SHUNT DE LA 5-LO VERS LES COXS

Nos résultats avec le NDGA nous ont permis de tirer d'autres conclusions à propos du « cross-talk » entre la voie de synthèse des COXs et celle des LOs. Dans un premier temps, le NDGA (un inhibiteur des 5-, 12- et 15-LO) ne semble pas inhiber la synthèse de LTB₄ dans des conditions non-stimulées. Comme il a été mentionné plus haut, la faible concentration des LTB₄ au niveau basal (à la limite de détection de la trousse d'analyse) explique ce phénomène. Cependant, dans des conditions stimulées, le NDGA réussit à diminuer la synthèse de LTB₄ de 50%. Il est intéressant de noter que la Licofelone inhibe plus efficacement la synthèse de LTB₄ dans les mêmes conditions. Puisque la Licofelone est un inhibiteur mixte et qu'elle peut inhiber plus efficacement la synthèse de LTB₄ que le NDGA, il serait intéressant de voir si la combinaison de NDGA avec le naproxen nous permettrait d'obtenir le même niveau d'inhibition que la Licofelone. Ceci pourrait également confirmer l'implication des PGE₂ dans la régulation de la synthèse des LTB₄. Dans un autre ordre d'idée, il a été démontré par nos résultats qu'il n'existe pas de « shunt » de la

voie de la 5-LO vers celle des COXs. Ceci est intéressant car il serait logique de croire que ce phénomène aurait pu avoir lieu puisqu'il est possible de l'induire dans le sens inverse (de la voie des COXs vers celle de la 5-LO). Cette absence de « shunt » dans des conditions basales pourrait s'expliquer par le faible niveau de synthèse des LTB₄. Par le fait même, ceci pourrait nous démontrer l'utilisation préférentielle de l'AA par les COXs pour la synthèse des PGE₂.

LES INHIBITEURS ET LA LXA₄

La synthèse des lipoxines est une nouvelle voie métabolique de l'AA qui a été récemment découverte. Ces médiateurs sont synthétisés lors d'interactions intercellulaires et auraient la propriété de freiner l'inflammation (Serhan, 1997; Brady et Serhan, 1996). Nos résultats ont permis de montrer que dans des conditions basales, le naproxen n'a aucun effet sur la synthèse de LXA₄. Cependant, dans des conditions stimulées, nous assistons à une diminution de la synthèse de LXA₄ en présence de naproxen. Ceci nous indique que dans des conditions basales, la synthèse de LXA₄ dépend principalement de la 5-LO activée. Il en est tout autrement dans des conditions stimulées. En effet, il est connu que le LPS est en mesure d'activer de nombreuses voies métaboliques intracellulaires qui seraient régulées par la PGE₂. Il a été démontré que l'augmentation de la synthèse de LXA₄ serait reliée à une stimulation de la 15-LO par les PGE₂ (Levy et *al.*, 2001).

Il a été démontré que les PGE₂ étaient non seulement responsables (en partie) de l'inflammation, mais jouaient un rôle important dans la résolution de l'inflammation (Weissmann, 1993). En effet, nous avons déjà démontré que l'ajout de petites quantités de PGE₂ exogène renversait partiellement le shunt (synthèse de LTB₄). Levy et *al.* (2001) ont également démontré que les PGE₂ provoquaient un changement dans la voie métabolique des LOs. En présence de PGE₂, les PMN synthétisent plus de LXA₄ au détriment du LTB₄. Sachant que le LXA₄ possède des propriétés anti-inflammatoires, nous pouvons donc affirmer une fois de plus que les

PGE₂ jouent un rôle crucial dans la résolution de l'inflammation. Nous retrouvons sensiblement la même chose dans notre modèle expérimental. En effet, avec le NS-398 et la Licofelone, qui n'induisent pas le « shunt », il y a une diminution de la synthèse de LXA₄. Ceci serait dû au fait que ces molécules inhibent efficacement la synthèse des PGE₂. Le niveau des PGE₂ étant au plus bas, ceux-ci ne peuvent plus jouer leur rôle dans la résolution de l'inflammation, c'est-à-dire favoriser la synthèse de LXA₄. Ceci expliquerait donc la diminution du niveau de LXA₄ comparativement au contrôle. Un autre fait intéressant est que le « shunt » est en mesure de maintenir stable la synthèse de LXA₄. En effet, la production de ce médiateur est maintenue avec le naproxen qui est le seul à induire le « shunt ». Deux explications seraient alors possibles. La première explication, qui est peu probable, serait que le LTB₄ pourrait être impliqué dans la résolution de l'inflammation au même titre que les PGE₂. La deuxième explication viendrait du fait que le naproxen puisse activer la voie PPAR- γ , qui pourrait maintenir la synthèse de LXA₄ malgré la diminution de synthèse des PGE₂. Il serait donc intéressant de voir si la co-incubation de naproxen et de NDGA pourrait induire une diminution dans la synthèse de LXA₄. Ceci nous permettrait de voir si le « shunt » est en cause dans le maintien de la synthèse de LXA₄. Il serait également important de vérifier cette hypothèse à l'aide d'un autre AINS comme l'indométhacin (inhibiteur des COXs) afin de voir si les résultats obtenus avec le naproxen ne sont pas le fruit d'un effet particulier de ce dernier (activation de la voie PPAR- γ). L'indométhacin pourrait également être utilisé pour les expériences portant sur la production de LTB₄.

Des études récentes dans un autre modèle expérimental ont démontré que le ratio LTB₄/LXA₄ pourrait jouer un rôle important dans l'inflammation (Boutet et *al.*, 2003). Ce ratio LTB₄/LXA₄ pourrait effectivement nous en dire plus long sur les effets physiologiques réels des molécules utilisées dans notre recherche. En ce sens, si ce ratio est élevé, l'inflammation est favorisée. Dans le cas contraire, c'est un effet anti-inflammatoire bénéfique qui est favorisé. Dans le même ordre d'idée, il peut paraître un peu incompréhensible de développer une molécule comme la Licofelone

qui inhibe la synthèse de LXA₄ sachant que ce médiateur possède des effets anti-inflammatoires. En effet, il a été démontré que la LXA₄ pouvait inhiber la synthèse d'IL-6, d'IL-8 et de MMP3 induite par l'IL-1 β et qu'elle pouvait également augmenter la synthèse des TIMP (Sodin-Semrl et *al.*, 2000). Cependant, si nous regardons le ratio LTB₄/LXA₄, nous voyons que celui-ci demeure au même niveau que le contrôle et ce, tant dans des conditions stimulées que dans des conditions non-stimulées. Ceci est dû à l'inhibition de la synthèse des LTB₄ par la Licofelone. Il en est tout autrement avec le naproxen. En effet, le ratio LTB₄/LXA₄ est beaucoup plus élevé que le contrôle dans des conditions stimulées ou non. Il serait alors possible de croire qu'en absence d'inflammation, le naproxen induit le « shunt » et augmente par conséquent la synthèse de LTB₄. Ceci aurait pour effet d'induire un processus inflammatoire de façon chronique. Aussi, en présence d'une inflammation, le naproxen pourrait diminuer la synthèse de LXA₄ (et augmenter le ratio LTB₄/LXA₄), ce qui aurait pour effet de favoriser d'avantage le processus inflammatoire et d'accélérer les lésions au niveau du cartilage.

EFFET DU LTB₄ SUR IL-1 β

Il a déjà été démontré que le LTB₄ pouvait affecter la synthèse d'IL-1 β dans la MS (He et *al.*, 2002; Rainsford et *al.*, 1996; Kageyama et *al.*, 1994). Il s'est alors avéré intéressant de vérifier si le « shunt » induit par le naproxen pouvait moduler la synthèse d'IL-1 β . Les résultats obtenus nous ont permis de constater qu'il était possible d'avoir une augmentation de la synthèse d'IL-1 β seulement en présence de LPS et de naproxen simultanément. Les études précédentes ont démontré que le LTB₄ pouvait induire la synthèse d'IL-1 β (He et *al.*, 2002; Kageyama et *al.*, 1994). Cependant, les concentrations de LTB₄ utilisées dans les études précédentes étaient élevées (10⁻⁹ M et 10⁻⁸ M) faisant en sorte que d'autres voies de signalisation, aussi présentes dans des conditions stimulées (avec le LPS), auraient pu être recrutées. D'un autre côté, la production d'IL-1 β peut être régulée à différents niveaux :

transcriptionnel, post-transcriptionnel, la synthèse protéique et la maturation de la protéine. Dans des conditions non-stimulées, le LTB₄ seul ne peut moduler la synthèse d'IL-1 β . Cependant, en présence de LPS, qui imite les conditions inflammatoires et active différentes voies de signalisation, le LTB₄ pourrait moduler l'une de ces voies et augmenter la synthèse de l'IL-1 β . Il a déjà été démontré que le LTB₄ pouvait avoir des effets différents dans des conditions stimulées et non-stimulées. Faour et *al.* (2001), ont démontré que le PGE₂ et le LTB₄ pouvaient atténuer l'inhibition du NS-398 exercée sur l'expression de la COX-2 (induite par l'IL-1 β). Cependant, les PGE₂ et le LTB₄ n'avaient pas d'effet sur des fibroblastes non-stimulés de la MS. Jiang et *al.* (1998), ont suggéré que la voie de stimulation du LPS pourrait suppléer la voie du PPAR- γ dans les MS arthrosiques. D'une façon globale, la principale différence entre le naproxen et la Licofelone réside dans la capacité de cette dernière à inhiber la synthèse de LTB₄. Ceci nous donne un bon indice sur le fait que le LTB₄ serait un cofacteur important dans la synthèse d'IL-1 β dans la MS arthrosique. Ceci nous démontre par le fait même le rôle central du LTB₄ dans l'arthrose. En effet, dès que la synthèse de celui-ci est induite, une réaction en chaîne s'amorce. Le LTB₄, de par son effet chimiotactique, recrute des PMN et des macrophages qui vont accentuer les lésions au cartilage en produisant des cytokines, des protéases et d'autres leucotriènes (LTB₄) entre autre. Ce faisant, encore plus de débris cartilagineux sont relâchés dans le liquide synovial, ce qui a pour effet d'accentuer d'avantage l'inflammation de la MS. D'autre part, l'apport accru de LTB₄ par les cellules infiltrantes permet un recrutement plus important de ces cellules et pourrait stimuler la synthèse de l'IL-1 β qui, comme nous le savons, joue un rôle primordial dans l'arthrose. Toutes ces réactions prennent alors l'allure d'une boucle de rétroaction positive et nous entrons alors dans un cercle vicieux qui se perpétue jusqu'à la destruction totale du cartilage (l'éburnation). Ceci nous démontre alors l'importance de contrôler la synthèse du LTB₄ lors de la pathologie afin de mieux contrôler l'inflammation et de donner une chance au cartilage de se régénérer, ou du moins, de se maintenir stable.

CONCLUSION

Notre étude nous a permis de démontrer que le métabolisme de l'AA dans la MS arthrosique se faisait préférentiellement par la voie de synthèse des COXs. Cependant, lorsque cette voie de synthèse est bloquée par un AINS tel que le naproxen, nous assistons à une redirection dans l'utilisation de l'AA. En effet, avec le « shunt », il y a une augmentation de la synthèse des LTB₄ par la voie de la 5-LO. Ce phénomène s'accompagne également d'une augmentation du ratio LTB₄/LXA₄, ce qui a pour effet de favoriser l'inflammation et par conséquent, la destruction du cartilage. L'augmentation de la synthèse des LTB₄ est aussi à l'origine d'une augmentation de la production d'IL-1 β . Sachant que cette cytokine joue un rôle primordial dans l'arthrose, il n'en faut pas plus pour comprendre que cette augmentation de synthèse pourrait avoir des effets catastrophiques pour la dégradation du cartilage et pour l'intégrité et la fonctionnalité de l'articulation.

Dans notre étude nous avons également constaté que non seulement le naproxen n'est pas en mesure d'inhiber la synthèse de LTB₄, mais qu'il cause un « shunt » des COXs vers la 5-LO. Ceci fait en sorte que cette drogue n'est pas aussi efficace que nous le voudrions à long terme. C'est bien d'inhiber la synthèse des PGE₂ impliquées dans l'inflammation, mais encore faut-il limiter la production de LTB₄ qui est impliqué dans le maintien et l'accentuation de l'inflammation. Le naproxen est bien pour les douleurs inflammatoires de courtes durées, mais quand il faut traiter une pathologie à long terme comme l'arthrose, il est préférable d'utiliser une molécule (telle la Licofelone) plus efficace qui pourra limiter la production de tout médiateur de l'inflammation. De leur côté, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 possèdent l'avantage de ne pas causer de « shunt » comparativement au naproxen. Ceci permet de mieux contrôler l'inflammation puisque nous ne stimulons pas la synthèse de LTB₄, ce qui n'est pas le cas du naproxen. L'autre avantage des inhibiteurs sélectifs de COX-2 face au naproxen, est que ceux-ci n'inhibent pas

l'activité de la COX-1. Nous savons que cette isoforme de la COX est essentielle pour la protection de la muqueuse gastrique. Par conséquent, c'est l'inhibition de la COX-1 qui est responsable du principal effet secondaire du naproxen, c'est-à-dire la formation d'ulcères gastriques. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 ne présentent pas ce problème, car ils n'affectent pas la COX-1.

L'utilisation d'un inhibiteur mixte comme la Licofelone est préférable pour le traitement de l'arthrose. En effet, bien que cette molécule puisse inhiber la COX-1, le fait qu'elle puisse inhiber la synthèse de LTB₄ vient diminuer grandement les troubles gastro-intestinaux. En effet, le LTB₄ est en partie responsable de la formation d'ulcères gastriques via son effet chimiotactique. Nous ne réglons pas totalement le problème à ce niveau, mais c'est beaucoup mieux comparativement au naproxen. Un autre avantage majeur est qu'un inhibiteur mixte peut empêcher le « shunt ». Ceci permet alors de limiter plus efficacement l'inflammation et de diminuer les lésions au niveau du cartilage articulaire. Ceci est également un avantage face aux Coxibs, car ceux-ci ne sont pas en mesure d'inhiber la synthèse de LTB₄ bien qu'ils ne causent pas de « shunt » concrètement. Par conséquent, la Licofelone représente une nouvelle molécule potentiellement intéressante dans le traitement de l'arthrose.

BIBLIOGRAPHIE

ARTICLES

A

Aharony D, Stein RL 1986. Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase. *J Biol Chem.* 261(25):11512-9

Aidinis V, Plows D, Haralambous S, Armaka M, Papadopoulos P, Kanaki MZ, Koczan D, Thiessen HJ, Kollias G 2003. Functional analysis of an arthritogenic synovial fibroblast. *Arthritis Res & Ther.* 5(3):140-57

Allan D A, Mandel R J, Leatherwood D F 1998. Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries. *Clin Orthop.* 351:32-8

Alvaro-Gracia JM 2004. Licofelone--clinical update on a novel LOX/COX inhibitor for the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 43 Suppl 1:I21-I25

Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, Stuchin SA, Patel IR, Abramson SB 1997. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest.* 1997 Mar 15;99(6):1231-7

Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB 1995. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 182(6): 2097-102

Arakawa T, Higuchi K, Fukuda T, Fujiwara Y, Kobayashi K, Kuroki T 1998. Prostaglandins in the stomach: an update. *J Clin Gastroenterol.* 27 Suppl 1:S1-11

Ashhurst DE, Bland YS, Levick JR 1991. An immunohistochemical study of the collagens of rabbit synovial interstitium. *J Rheumatol.* 18(11):1669-72

Atik OS 1990. Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 39:253-354

Avis IM, Jett M, Boyle T, Vos MD, Moody T, Treston AM, Martinez A, Mulshine JL 1996. Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling. *J Clin Invest.* 97(3):806-13

B

Bailey A J, Mansell J P 1997. Do subchondral bone changes exacerbate or precede articular cartilage destruction in osteoarthritis of the elderly? *Gerontology* 43:296-304

- Bakhle YS** 1999. Structure of COX-1 and COX-2 enzymes and their interaction with inhibitors. *Drugs Today (Barc)*. 35(4-5):237-50
- Bannwarth B** 2004. Is licofelone, a dual inhibitor of cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase, a promising alternative in anti-inflammatory therapy? *Fundam Clin Pharmacol*. 18(1):125-30
- Barland P, Novikoff AB, Hamermann D** 1962. Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol* 14:207-20
- Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J, et al.** 1994. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta*. 1209(1):130-9
- Behera AK, Kumar M, Matsuse H, Lockey RF, Mohapatra SS** 1998. Respiratory syncytial virus induces the expression of 5-lipoxygenase and endothelin-1 in bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 251(3):704-9
- Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss M, Doherty M** 1997. Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Ann Rheum Dis* 56(5):299-307
- Belkner J, Wiesner R, Rathman J, Barnett J, Sigal E, Kuhn H** 1993. Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases. *Eur J Biochem*. 213(1):251-61
- Bell RL, Harris RR** 1999. The enzymology and pharmacology of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein. *Clin Rev Allergy Immunol*. 17(1-2):91-109
- Benderdour M, Hilal G, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Duval N, Martel-Pelletier J** 1999. Osteoarthritic osteoblasts show variable levels of cytokine production despite similar phenotypic expression [abstract]. *Arthritis Rheum*. 42:S251
- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR** 1986. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 319: 516-8
- Bettica P, Cline G, Hart DJ, Meyer J, Spector TD** 2002. Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study. *Arthritis Rheum*. 46(12):3178-84
- Bishop-Bailey D, Pepper JR, Haddad EB, Newton R, Larkin SW, Mitchell JA** 1997. Induction of cyclooxygenase-2 in human saphenous vein and internal mammary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17(9):1644-8
- Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA** 1998. Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18(10):1655-61
- Boileau C, Martel-Pelletier J, Jouzeau JY, Netter P, Moldovan F, Laufer S, Tries S, Pelletier JP** 2002a. Licofelone (ML-3000), a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, reduces the level of cartilage chondrocyte death in vivo in experimental dog osteoarthritis: Inhibition of pro-apoptotic factors. *Journal of Rheumatology*. 29(7):1446-1453

- Boileau C** 2002b. Conséquences articulaires de la sélectivité d'inhibition des COXs par les AINS dans des modèles expérimentaux d'arthropathie. Thèse
- Bonnet C, Bertin P, Cook-Moreau J, Chable-Rabinovitch H, Treves R, Rigaud M** 1995. Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells. *Prostaglandins*. 50(3):127-35
- Borgeat P, Naccache PH** 1990. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B4. *Clin Biochem*. 23(5):459-68
- Boskey AL, Posner AS** 1984. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am*. 15(4):597-612
- Botting R** 2003. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res*. 110(5-6):269-72
- Boutet P, Bureau F, Degand G, Lekeux P** 2003. Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. *J Dairy Sci*. 86(11):3430-9
- Brady HR, Serhan CN** 1996. Lipoxins: putative braking signals in host defense, inflammation and hypersensitivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5:20-27
- Breyer M D, Breyer R M** 2000. Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 9(1):23-9
- Brinckmann R, Heydeck D, Kolde G, Kuhn H** 1997. Subcellular localization of the 15-lipoxygenase in mammalian cells. *Adv Exp Med Biol*. 407:27-32
- Brock TG, Maydanski E, McNish RW, Peters-Golden M** 2001. Co-localization of leukotriene a4 hydrolase with 5-lipoxygenase in nuclei of alveolar macrophages and rat basophilic leukemia cells but not neutrophils. *J Biol Chem*. 276(37):35071-7
- Brock TG, McNish RW, Bailie MB, Peters-Golden M** 1997. Rapid import of cytosolic 5-lipoxygenase into the nucleus of neutrophils after in vivo recruitment and in vitro adherence. *J Biol Chem*. 272(13):8276-80
- Brune K** 2004. Safety of anti-inflammatory treatment--new ways of thinking. *Rheumatology (Oxford)*. 43 Suppl 1:I16-I20
- Buckwalter JA, Mankin HJ** 1997a. Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surg*. 79A:600-11
- Buckwalter JA, Mankin HJ** 1997b. Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone Joint Surg*. 79A:612-32
- Buckwalter JA, Mankin HJ** 1998. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*. 47:487-504
- Buckwalter JA, Mankin HJ** 1998b. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*. 47:477-486
- Buckwalter JA, Martin J** 1996. Degenerative joint disease. *Clinical symposia 1* : 1-32

Bunning RA, Richardson HJ, Crawford A, Skjodt H, Hughes D, Evans DB, Gowen M, Dobson PR, Brown BL, Russell RG 1986. The effect of interleukin-1 on connective tissue metabolism and its relevance to arthritis. *Agents Actions Suppl.* 18:131-52

Burgeson RE, Nimmi ME 1992. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop.* 282:250-72

Burr DB, Schaffler MB 1997. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech.* 37(4):343-57

C

Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, Pelletier JP 1996. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum.* 39(9):1535-44

Celotti F, Durand T 2003. The metabolic effects of inhibitors of 5-lipoxygenase and of cyclooxygenase 1 and 2 are an advancement in the efficacy and safety of anti-inflammatory therapy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 71(3-4):147-62

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(21):13926-31

Chen XS, Kurre U, Jenkins NA, Copeland NG, Funk CD 1994. cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases. *J Biol Chem.* 269(19):13979-87

Chevalier X 1998. Physiopathogénie de l'arthrose: Le cartilage arthrosique. *La Presse Médicale* 27(2):81-7

Chevalier X 2000. Autologous chondrocytes implantation for cartilage defects: development and applicability to osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 67:572-8

Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R 2000. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res* 60(17): 4705-8

Clark A G, Jordan J M, Vilim V, Renner J B, Dragomir A D, Luta G, Kraus V B 1999. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum.* 42(11):2356-64.

Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL 1991. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell.* 65(6):1043-51

Clark IM, Powell LK, Ramsey S, Hazleman BL, Cawston TE 1993. The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 36(3):372-9

Cole A A, Kuettner K E 2002. Molecular basis for differences between human joints. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:19-26

Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH 1998. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med.* 76(3-4):275-88

Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T 1994. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest.* (3):1095-101

Crofford LJ 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol.* 24 Suppl 49:15-9

Cs-Szabo G, Melching LI, Roughley PJ, Glant TT 1997. Changes in messenger RNA and protein levels of proteoglycans and link protein in human osteoarthritic cartilage samples. *Arthritis Rheum.* 40(6):1037-45

Cs-Szabo G, Roughley PJ, Plaas AH, Glant TT 1995. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 38(5):660-8

Clària J, Serhan CN 1995. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21):9475-9

Culty M, Nguyen HA, Underhill CB 1992. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol.* 116:1055-62

Curtiss P 1964. Changes produced in the synovial membrane and synovial fluid by disease. *J. Bone Joint Surg.* 46-A: 873-88

D

Davies DV, Edwards D A W 1948. The blood supply of the synovial membrane and intra-articular structures. *Ann R Coll Surg.* 142-56

Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R 1999. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E₂ and interleukin-1beta. *Endocrinology* 140(6): 2685-95.

Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA 1986. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest.* 77(2):645-8

Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 84(2):678-85

de Leval X, Julemont F, Delarge J, Pirotte B, Dogne JM 2002. New trends in dual 5-LOX/COX inhibition. *Curr Med Chem.* 9(9):941-62

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

Di Battista JA, Fahmi H, He Y, Zhang M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP 2001. Differential regulation of interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 gene expression by nimesulide in human synovial fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol*. 19(1 Suppl 22):S3-5

Dijkgraaf L C, de Bont L G M, Boering G, Liem R S B 1996. Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: A review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 54:332-38

Dinchuk JE, Liu RQ, Trzaskos JM 2003. COX-3: in the wrong frame in mind. *Immunol Lett.* 86(1):121

E

Elliott S, Cawston T 2001. The clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in the rheumatic disorders. *Drugs Aging* 18(2):87-99

Espallargues M, Pons Joan M V 2003. Efficacy and safety of viscosupplementation with hylan G-F 20 for the treatment of knee osteoarthritis. *Int J of Tech Asses in Health Care* 19(1):41-56

Edwards JC 2000. Fibroblast biology: development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res* 2:344-47

Edwards JCW 1994. The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *J. Anat. (Pt 3)*:493-501

Edwards JCW, Willoughby DA 1982. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetics markers. *Ann Rheum Dis* 41(2):177-82

Evan AP, Gardner KD Jr 1979. Nephron obstruction in nordihydroguaiaretic acid-induced renal cystic disease. *Kidney Int.* 15(1):7-19

Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC 2001. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J Biol Chem.* 276(32):30150-60

Evans CH, Watkins SC, Stefanovic-Racic M 1996. Nitric oxide and cartilage metabolism. *Methods Enzymol.* 269:75-88

F

Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS 1993. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 52(12):870-5.

Faour W, He Y, de Ladurantaye M, He W, Quintero M, Mancini A 2001. Prostaglandin E2 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1beta treated synovial fibroblasts. *J Biol Chem.* 276:31720-3173

Felson D T, Lawrence R C, Dieppe P A, Hirsch R, Helmick C G 2000. Osteoarthritis: the disease and its prevalence and impact. In: Felson DT, conference chair. *Osteoarthritis new insights. Part 1: The disease and its risk factors.* *Ann Intern Med.* 133(8):635-6

Fiorucci S, Distrutti E, de Lima OM, Romano M, Mencarelli A, Barbanti M, Palazzini E, Morelli A, Wallace JL 2003. Relative contribution of acetylated cyclo-oxygenase (COX)-2 and 5-lipoxygenase (LOX) in regulating gastric mucosal integrity and adaptation to aspirin. *FASEB J*. 17(9):1171-3

Firestein GS, Paine MM, Littman BH 1991. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum*. 34(9):1094-105

Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR 1992. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem*. 267(7):4338-44

Ford-Hutchinson AW 1991. Arachidonate 15-lipoxygenase; characteristics and potential biological significance. *Eicosanoids*. 4(2):65-74

Ford-Hutchinson AW, Gresser M, Young RN 1994. 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem*. 63:383-417

Fransen M, McConnell S, Bell M 2002. Therapeutic exercise for people with osteoarthritis of the hip or knee. A systematic review. *J of Rheumatol*. 29:1727-45

Funk CD 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 294(5548):1871-5

Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA 1991. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J*. 5(9):2304-12

Futani H, Okayama A, Matsui K, Kashiwamura S, Sasaki T, Hada T, Nakanishi K, Tateishi H, Maruo S, Okamura H 2002. Relation between interleukin-18 and PGE2 in synovial fluid of osteoarthritis: a potential therapeutic target of cartilage degradation. *J Immunotherapy* 25(suppl. 1):S61-S64

G

Garavito RM 1996. The cyclooxygenase-2 structure: new drugs for an old target? *Nat Struct Biol*. 3(11):897-901

Gardner D L 1983. The nature and causes of osteoarthritis. *BMJ* 286:418-24

Gardner KD Jr, Reed WP, Evan AP, Zedalis J, Hylarides MD, Leon AA 1987. Endotoxin provocation of experimental renal cystic disease. *Kidney Int*. 32(3):329-34

Garnero P, Rousseau J-C, Delmas PD 2000. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis & Rheumatism* 43(5):953-68

Gillmor SA, Villasenor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF 1997. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol*. 4(12):1003-9. Erratum in: *Nat Struct Biol* 5(3):242

Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul Clark MJ, Willoughby DA 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 5(6): 698-701.

- Goggs R, Carter S D, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M, Mobasheri A** 2003. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *The Veterinary Journal* 166:140-158
- Golden BD, Abramson SB** 1999. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Rheum Dis Clin North Am.* 25(2):359-78
- Goldberg RL, Huff JP, Lenz ME, Glickman P, Katz R, Thonar EJ** 1991. Elevated plasma levels of hyaluronate in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34(7):799-807
- Goldring MB** 2000a. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 43:1916-26
- Goldring MB** 2000b. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep.* 2(6):459-65
- Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM** 1988. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest.* 82(6):2026-37
- Goldring MB, Suen LF, Yamin R, Lai WF** 1996. Regulation of Collagen Gene Expression by Prostaglandins and Interleukin-1beta in Cultured Chondrocytes and Fibroblasts. *Am J Ther.* 3(1):9-16
- Goppelt-Struebe M** 1995. Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 52(4):213-22
- Graabaek PM**, 1982. Ultrastructural evidence for two distinct types of synoviocytes in rat synovial membrane. *J Ultrastruct Res.* 78:321-39
- Graabaek PM**, 1984. Characteristics of the two types of synoviocytes in rat synovial membrane. An ultrastructural study. *Lab Invest.* 50:690-702
- Green J** 1994. The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. *Miner Electrolyte Metab.* 20(1-2):7-15
- Gross G, Imamura T, Vogt SK, Wozniak DF, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ** 2000. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000 Jun 278(6): R1415-23.
- Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ** 1998. Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11875-9.
- Guévremont M, Martel-Pelletier J, Massicotte F, Tardif G, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D, Reboul P** 2003. Human adult chondrocytes express hepatocyte growth factor (HGF) isoforms but not HgF: potential implication of osteoblasts on the presence of HGF in cartilage. *J Bone Miner Res.* 18(6):1073-81
- Guincamp C, Pap J, Schedel J, Pap G, Moller-Ladner U, Gay R E, Gay S** 2000. Gene therapy in osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 67:570-1

H

- Haeggstrom JZ, Kull F, Rudberg PC, Tholander F, Thunnissen MM** 2002. Leukotriene A4 hydrolase. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68-69:495-510
- Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS** 2002. Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys. Arthritis Rheum. 46(7):1956-64
- Hamerman D, Klagsbrunn M** 1985. Osteoarthritis – Emerging evidence for cell interactions in the breakdown and remodelling of cartilage. Am J Med 78:495-9
- Haq I, Murphy E, Dacre J** 2003. Osteoarthritis. Postgrad. Med. J 79:377-383
- Hardingham TE, Fosang AJ** 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. FASEB J. 6(3):861-70
- Harizi H, Juzan M, Moreau J-F, Gualde N** 2003. Prostaglandins Inhibit 5-Lipoxygenase Activating Protein Expression and Leukotriene B4 Production from Dendritic Cells Via an IL-10-Dependent Mechanism. J immunol. 170:139-46
- Hascall VC** 1988. Proteoglycans : The chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan of cartilage. ISI Atlas Sci. Biochem. 1:189-98
- Hauselmann HJ, Oppliger L, Michel BA, Stefanovic-Racic M, Evans CH** 1994. Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. FEBS Lett. 352(3):361-4
- He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA** 2002. Synthesis of interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. J Rheumatol. 29(3):546-53
- Hebert RL, Breyer RM, Jacobson HR, Breyer MD** 1995. Functional and molecular aspects of prostaglandin E receptors in the cortical collecting duct. Can J Physiol Pharmacol. 73(2):172-9
- Hedbom E, Häuselmann H J** 2002. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. Cellular and Molecular Life Sciences 59:45-53
- Henderson B, Pettipher E R** 1985. The synovial lining cell: biology and pathobiology. Semin. Arth. Rheum. 15:1-32
- Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D** 1998. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. Arthritis Rheum. 41(5):891-9
- Hilal G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Lajeunesse D** 1999. Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. Arthritis Rheum. 42(10):2112-22
- Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Pelletier JP, Lajeunesse D** 2001. Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. J Bone Miner Res. 16(4):713-21

Hinton R, Moody Ron L, Davis Alan W, Thomas Sean F 2002. Osteoarthritis : Diagnosis and therapeutic considerations. *American Family Physician* 65(5):841-8

Hirabayashi T, Kume K, Hirose K, Yokomizo T, Iino M, Itoh H, Shimizu T 1999. Critical duration of intracellular Ca²⁺ response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem.* 274(8):5163-9

Huber M, Trattig S, Lintner F 2000. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol.* 35(10):573-80

Hudson N, Balsitis M, Everitt S, Hawkey CJ 1993. Enhanced gastric mucosal leukotriene B₄ synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 34:742-7

Huebner JL, Hanes MA, Beekman B, TeKoppele JM, Kraus VB 2002. A comparative analysis of bone and cartilage metabolism in two strains of guinea-pig with varying degrees of naturally occurring osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* (10):758-67

Hurley M V 2003. Muscle dysfunction and effective rehabilitation of knee osteoarthritis: What we know and what we need to find out. *Arthritis & Rheumatism* 49(3):444-452

Huskisson E C, Dieppe P A, Tucker A K, Cannell L B 1979. Another look at osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 38:423-8

Hussain H, Shornick LP, Shannon VR, Wilson JD, Funk CD, Pentland AP, Holtzman MJ 1994. Epidermis contains platelet-type 12-lipoxygenase that is overexpressed in germinal layer keratinocytes in psoriasis. *Am J Physiol.* 266(1 Pt 1):C243-53

I

Ibbotson KJ, Roodman GD, McManus LM, Mundy GR 1984. Identification and characterization of osteoclast-like cells and their progenitors in cultures of feline marrow mononuclear cells. *J Cell Biol.* 99(2):471-80

Imhof H, Breitscheher M, Kainberger F, Rand T, Trattig S 1999. Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging.* 10(3):180-92

Imhof H, Nöbauer-Huhmann I-M, Gahleitner A, Kainberger F, Krestan C, Sulzbacher I, Trattig S 2002. Pathophysiology and imaging in inflammatory and blastomatous synovial diseases. *Skeletal Radiol.* 31:313-33

Imhof H, Breitscheher M, Kainberger F, Rand T, Trattig S 1999. Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging.* 10(3):180-92

Iozzo RV 1998. Matrix proteoglycans from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67:609-52

Itonaga I, Kato T, Torisu T, Masumi S 1997. Experimental study of drainage and granulation in response to the intra-articular injection of particles in rat knee joints. *J. Orthop. Sci.* 2:24-30

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.* 63(1):17-31

J

Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B 1999. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(13):7220-5

Jaradat MS, Wongsud B, phomchirasilp S, et al 2001. Activation of peroxisome proliferators-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 62:1587-1595

Jiang C, Ting AT, Seed B 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 391:82-86

Jovanovic DV, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, Reboul P, Laufer S, Tries S, Pelletier JP 2001. In vivo dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis: suppression of collagenase 1 and interleukin-1beta synthesis. *Arthritis Rheum*. 44(10):2320-30

Johnston SA 1997. Osteoarthritis: Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clinics of North America* 27(4):699-723

Jordan JM 1999. Effect of race and ethnicity on outcomes in arthritis and rheumatic conditions. *Curr opinion in Rheum*. 11(2):98-103

Jouzeau JY, Gillet P, Netter P 2000. Interest of animal models in the preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs. *Joint Bone Spine* 67:565-9

Ju WK, Neufeld AH 2002. Cellular localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the normal mouse, rat, and human retina. *J Comp Neurol*. 452(4):392-9

Jüsten H-P, Grünwald E, Gudrun Totzke, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Wessinghage D, Vetter H, Schulz-Osthoff K, Ko Y 2000. Differential gene expression in synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Mol. Cell Biol. Res. Comm*. 3:165-72

K

Kageyama Y, Koide Y, Miyamoto S, Yoshida TO, Tnoue T 1994. Leukotrien B₄-induced interleukin-1 β in synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 23:148-150

Kalgutkar AS, Crews BC, Rowlinson SW, Marnett AB, Kozak KR, Remmel RP, Marnett LJ 2000. Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(2):925-30

Kemal C, Louis-Flamberg P, Krupinski-Olsen R, Shorter AL 1987. Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry*. 26(22):7064-72

Kerin A, Patwari P, Kuettner K, Cole A, Grodzinsky A 2002. Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:27-35

Knudson CB, Knudson W 2001. Cartilage proteoglycans. *Cell & devel. Biology* 12:69-78

- Kobayashi K, Fukuda T, Higuchi K, Nakamura H, Arakawa T** 1993. Role of leukotrienes in indomethacin-induced mucosal damage in rats. *J Clin Gastroenterol* 17(Suppl 1):S11-4
- Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nusing RM** 1997. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol.* 272(4 Pt 2):F460-8
- Komhoff M, Wang JL, Cheng HF, Langenbach R, McKanna JA, Harris RC, Breyer MD** 2000. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development. *Kidney Int.* 57(2):414-22
- Konttinen YT, Kemppinen P, Segerberg M, Hukkanen M, Rees R, Santavirta S, Sorsa T, Pertovaara A, Polak JM** 1994. Peripheral and spinal neural mechanisms in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. *Arthritis Rheum.* 1994 Jul;37(7):965-82
- Konttinen Y T, Li T-F, Mandelin J, Ainola M, Lassus J, Virtanen I** 2001. Hyaluronan synthases, hyaluronan, and its CD44 receptor in tissue around loosened total hip prostheses. *J. pathology* 194:384-90
- Konturek PC, Brzozowski T, Pierzchalski P, Kwiecien S, Pajdo R, Hahn EG, Konturek SJ** 1998. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats. *Aliment Pharmacol Ther.* 12(8):767-77
- Krane SM, Dayer JM, Simon LS, Byrne MS** 1985. Mononuclear cell-conditioned medium containing mononuclear cell factor (MCF), homologous with interleukin 1, stimulates collagen and fibronectin synthesis by adherent rheumatoid synovial cells: effects of prostaglandin E2 and indomethacin. *Coll Relat Res.* 5(2):99-117
- Kudo I, Murakami M** 2002. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:3-58
- Kuhn H, Belkner J, Wiesner R, Brash AR** 1990. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J Biol Chem.* 265(30):18351-61
- Kuhn H, Thiele BJ** 1999. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett.* 449(1):7-11
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR** 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 266(20):12866-72
- Kumon Y, Suehiro T, Nishiya K, Hashimoto K, Nakatani K, Sipe J D** 1999. Ferritin correlates with C-reactive protein and acute phase serum amyloid A in synovial fluid, but not in serum. *Amyloid.* 6(2):130-5
- Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM** 1996. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(10):4816-20
- Kuwamoto S, Inoue H, Tone Y, Izumi Y, Tanabe T** 1997. Inverse gene expression of prostacyclin and thromboxane synthases in resident and activated peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* 409(2):242-6

L

Lajeunesse D, Reboul P 2003. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol.* 15(5):628-33

Lane LB, Villacin A, Bullough PG 1977. The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. *J Bone Joint Surg Br.* 59(3):272-8

Laneville O, Breuer DK, Dewitt DL, Hla T, Funk CD, Smith WL 1994. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 271(2):927-34

Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD 1995. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83(3):483-92

Laufer S 2001, Discovery and development of ML3000. *Inflammopharmacology* 9:101-12

Laufer SA, Augustin J, Dannhardt G, Kiefer W 1994. (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Med Chem.* 37:12 1894-7

Lee TH, Mencia-Huerta JM, Shih C, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF 1984. Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxygenase pathway products by ionophore-activated human neutrophils. *J Clin Invest.* 74(6):1922-33

Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G 1990. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1052(3):366-78

Lemann J Jr, Lennon EJ 1972. Role of diet, gastrointestinal tract and bone in acid-base homeostasis. *Kidney Int.* 1(5):275-9

Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2:612-619

Liagre B, Vergne P, Rigaud M, Beneytout JL 1997. Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes. *FEBS Lett.* 414(1):159-64

Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91:2 197-208.

Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ 1993. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell.* 72(2):269-78

Lohmander L, Stephan 2000. What can we do about osteoarthritis? *Arthritis Res.* 2:95-100

Lohmander LS, Saxne T, Heinegard DK 1994. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 53(1):8-13

Luo M, Jones SM, Peters-Golden M, Brock TG 2003. Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(21):12165-70

Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF 1996. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol.* 3(11):927-33

M

Malemud CJ, Papay RS, Hering TM, Holderbaum D, Goldberg VM, Haqqi TM 1995. Phenotypic modulation of newly synthesized proteoglycans in human cartilage and chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 3(4):227-38

Mancini JA, Abramovitz M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, Wang Z, Prasit P, Vickers PJ 1993. 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett.* 318(3):277-81

Mapp P, Kidd B, Gibson S, Terry JM, Revell PA, Ibrahim NBN, Blake DR, Polak JM 1990. Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 37(1):143-53

Mapp P, Walsh D, Kidd B, Cruwys SC, Polak JM, Blake DR 1992. Localization of the enzyme neutral endopeptidase to the human synovium. *J Rheumatol.* 19(12):1838-44

Marks SC Jr, Popoff SN 1988. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat.* 183(1):1-44

Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP 2003. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis.* 62(6):501-9

Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP 1994. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* 70(6):807-15

Martel-Pelletier J, Zafarullah M, Kodama S, Pelletier JP 1991. In vitro effects of interleukin 1 on the synthesis of metalloproteases, TIMP, plasminogen activators and inhibitors in human articular cartilage. *J Rheumatol.* 18(Suppl. 27):80-4

Martin JA, Buckwalter JA 2002. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology* 3:257-264

Martin JA, Buckwalter JA 2001. Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. *Iowa Orthop J.* 21:1-7

Marx RE, Garg AK 1998. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.* 7(4):267-76

Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 12;91(8):3228-32

- Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier JP, Hilal G, Duval N, 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(6):491-500
- Maycock AL, Anderson MS, DeSousa DM, Kuehl FA Jr** 1982. Leukotriene A4: preparation and enzymatic conversion in a cell-free system to leukotriene B4. *J Biol Chem*. 257(23):13911-4
- McMillan RM, Walker ER** 1992. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. 13(8):323-30
- Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, Springer TA** 1987. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest*. 80(2):535-44
- Mitchell JA, Evans TW** 1998. Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm Res*. 47 Suppl 2:S88-92
- Mitchell JA, Warner TD** 1999. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol*. 128(6):1121-32
- Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, Wada K, Uchida T, Noguchi H, Akamatsu T, Kasuga M** 1997. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* 112(2): 387-97
- Mollenhauer J, Bee JA, Lizarbe MA, von der Mark K** 1984. Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol*. 98(4):1572-9
- Mollenhauer J A, Erdmann S** 2002. Introduction: molecular and biomechanical basis of osteoarthritis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:3-4
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR** 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 263(5579):663-5
- Morita I** 2002. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins and other Lipid Mediators* 68-69:165-75
- Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL** 1995. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem*. 270(18):10902-8
- Mow VC, Ratcliff A, Poole AR** 1992. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13:67-97
- Muir H** 1995. The chondrocyte, architect of cartilage: Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays* 17(12):1039-48
- Muldrew K** 2002. Osteoarthritis as an inevitable consequence of the structure of articular cartilage. *Medical Hypotheses* 59(4):389-397
- Müller-Ladner U** 1996. Molecular and cellular interactions in rheumatoid synovium. *Curr Opin Rheumatol*. 8(3):210-20

Murrell GA, Jang D, Williams RJ 1995. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun.* 206(1):15-21

Myers SL, Flusser D, Brandt KD, Heck DA 1992. Prevalence of cartilage shards in synovium and their association with synovitis in patients with early and endstage osteoarthritis. *J Rheumatol.* 19(8):1247-51

N

Nakamura M, Ueda N, Yamamoto S, Ishimura K, Uchida N, Arase S 1997. Tissue distribution and subcellular localization of platelet-type arachidonate 12-lipoxygenase. *Adv Exp Med Biol.* 407:15-20

Nakano T, Thompson JR, Christopherson RJ, Aherne FX 1986. Blood flow distribution in hind limb bones and joint cartilage from young growing pigs. *Can J Vet Res.* 50(1):96-100

Nathan RA 1996. Anti-leukotriene agents: a new direction in asthma therapy. *J Asthma.* 33(6):353-66

Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem.* 55:69-102

O

Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T 2002. Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clinical Exp. Rheumatol.* 20: 633-40

Ogino N, Miyamoto T, Yamamoto S, Hayaishi O 1977. Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vesicular gland microsomes, a glutathione-requiring enzyme. *J Biol Chem.* 252(3):890-5

Okada Y, Naka K, Minamoto T, Ueda Y, Oda Y, Nakanishi I, Timpl R 1990. Localization of type VI collagen in the lining cell layer of normal and rheumatoid synovium. *Lab Invest.* 63(5):647-56

Okada Y, Nakanishi I, Kajikawa K, 1981. Ultrastructure of the mouse synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 24:835-43

Okada Y, Nakanishi I, Kajikawa K, 1981a. Secretory granules of B-cells in the synovial membrane: An ultrastructure and cytochemical study. *Cell Tissue Res.* 216:131

O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW 1993. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* 330(2):156-60

Orning L, Hammarstrom S 1980. Inhibition of leukotriene C and leukotriene D biosynthesis. *J Biol Chem.* 255(17):8023-6

Owen M 1980. The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis Rheum.* 23:1073-80

P

Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Lajeunesse D 2002. Study of role of leukotriene B₄ in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts. Effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis Rheum.* 46: 1804-1812

Pasquali-Ronchetti I, Frizziero L, Guerra D, Bacarani-Contri M, Focherini MC, Georgountzos A, Vincenzi D, Cicchetti F, Perbellini A, Govoni E 1992. Aging of the human synovium: an in vivo and ex vivo morphological study. *Semin Arthritis Rheum* 21(6):400-14

Pelletier JP, Boileau C, Jouzeau JY, Netter P, Moldovan F, Laufer S, Tries S, Martel-Pelletier J 2002. Licofelone (ML-3000), a dual inhibitor of both 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, reduces the level of cartilage chondrocyte death in vivo in experimental dog osteoarthritis: inhibition of proapoptotic factors. *Ann Rheum Dis* 61(Suppl 1) [abstract 198]

Pelletier J-P, Faure M P, DiBattista J A, Wilhelm S, Visco D, Martel-Pelletier J 1993. Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-1, and oncogene proteins in experimental osteoarthritis. An immunohistochemical study. *Am J Pathol.* 142(1):95-105.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J 2002. The Novartis-ILAR Rheumatology Prize 2001 Osteoarthritis: from molecule to man. *Arthritis Res.* 4(1):13-9

Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Abramson S B 2001a. Osteoarthritis, an inflammatory disease : Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism* 44(6):1237-47

Pelletier J-P, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J 1996. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* 4(1): 77-84

Pelletier J-P, Roughley PJ, DiBattista JA, McCollum R, Martel-Pelletier J 1991. Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin Arthritis Rheum.* 20(6 Suppl 2):12-25

Peters-Golden M, Song K, Marshall T, Brock T 1996. Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem J.* 318(Pt 3):797-803

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

Pfaffle M, Borchert M, Deutzmann R, von der Mark K, Fernandez MP, Selmin O, Yamada Y, Martin G, Ruggiero F, Garrone R 1990. Anchorin CII, a collagen-binding chondrocyte surface protein of the calpactin family. *Prog Clin Biol Res.* 349:147-57

Pittsillides AA, Archer CW, Prehm P, Bayliss MT, Edwards JC 1995. Alteration in hyaluronan synthesis during developing joint cavitation. *J. Histochem. Cytochem.* 43:263-73

Plows D, Probert L, Georgopoulos S, et al. 1995. The role of tumour necrosis factor (TNF) in arthritis : studies in transgenic mice. *Rheumatol Eur. Suppl* 2:51-4

Poole A R, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Mwale F, Kojima T, Sakai T, Wahl C, El-Maadawy S, Webb G, Tchetina E, Wu W 2002. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 61(suppl II):ii78-ii81

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S 2001. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop.* (391 Suppl):S26-33

Praest BM, Greiling H, Kock R 1997. Assay of synovial fluid parameters: hyaluronan concentration as a potential marker for joint diseases. *Clin Chim Acta.* 266(2):117-28

Prasit P, Wang Z, Brideau C, Chan CC, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans JF, Ford-Hutchinson AW, Gauthier JY, Gordon R, Guay J, Gresser M, Kargman S, Kennedy B, Leblanc Y, Leger S, Mancini J, O'Neill GP, Ouellet M, Percival MD, Perrier H, Riendeau D, Rodger I, Zamboni R, et al. 1999. The discovery of rofecoxib, [MK 966, Vioxx, 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2-inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett.* 9(13):1773-8

Prete PE, Gurakar-Osborne A 1997. The contribution of synovial fluid lipoproteins to the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Prostaglandins* 54:689-698 42

R

Rådmark O 2002. Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:211-34

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S 1976. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J Pharmacol.* 92:181-7

Rainsford KD, Ying C, Smith F 1996. Effects of 5-lipoxygenase inhibitors on interleukin production by human synovial tissues in organ culture: comparison with interleukin-1-synthesis inhibitors. *J Pharm Pharmacol.* 48:46-52

Rapoport SM, Schewe T, Wiesner R, Halangk W, Ludwig P, Janicke-Hohne M, Tannert C, Hiebsch C, Klatt D 1979. The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. *Eur J Biochem.* 96(3):545-61

Rédini F 2001. Structure et regulation de l'expression des protéoglycanes du cartilage articulaire. *Pathol Biol.* 49 :364-75

Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B, Lotz M 1994. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage.* 2(3): 199-206

Reid GK, Kargman S, Vickers PJ, et al 1990. Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J Biol Chem* 265:19818-19823

Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL 1996. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest.* 98(9):2076-85

Riendeau D, Falgoutyret JP, Guay J, Ueda N, Yamamoto S 1991. Pseudoperoxidase activity of 5-lipoxygenase stimulated by potent benzofuranol and N-hydroxyurea inhibitors of the lipoxygenase reaction. *Biochem J.* 274 (Pt 1):287-92

Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T 1994. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 269(16):11769-75

Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR 1992. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest.* 90(6):2268-77

Roberts WE, Turley PK, Brezniak N, Fielder PJ 1987. Implants: Bone physiology and metabolism. *CDA J.* 15(10):54-61

Robey PG, Termine JD 1985. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 37(5):453-60

Rocca B, Spain LM, Pure E, Langenbach R, Patrono C, FitzGerald GA 1999. Distinct roles of prostaglandin H synthases 1 and 2 in T-cell development. *J Clin Invest* 103(10) 1469-77

Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, Kuehl TJ, Mundy GR 1987. $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8213-17

Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M 1999. Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 66(1):76-84

Roth GJ, Stanford N, Majerus PW 1975. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci* 72(8):3073-6

Roughley PJ 2001. Articular cartilage and changes in arthritis : Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res.* 3:342-7

Roughley PJ, Lee ER 1994. Cartilage proteoglycans : Structure and potential functions. *Microscopy Res. Tech.* 28 :385-97

Router CA, Samuelsson B 1990. Leukocyte arachidonate 5-lipoxygenase: isolation and characterization. *Methods Enzymol* 187:312-319

S

Samuelsson B 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* 220(4597):568-75

Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 237(4819):1171-6

Sandell L J, Aigner T 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 3:107-113

Satku K 2003. Unicompartmental knee arthroplasty: is it a step in the right direction?--Surgical options for osteoarthritis of the knee. *Singapore Med J.* 44(11):554-6

Schewe T, Kuhn H, Rapoport SM 1986. Positional specificity of lipoxygenases and their suitability for testing potential drugs. *Prostaglandins Leukot Med* 23:155-160

Serhan CN 1997. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins* 53:107-37.

- Serhan CN, Haeggstrom JZ, Leslie CC** 1996. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J.* 10(10):1147-58
- Serhan CN, Levy BD, Clish CB, Gronert K, Chiang N** 2000. Lipoxins, aspirin-triggered 15-epi-lipoxin stable analogs and their receptors in anti-inflammation: a window for therapeutic opportunity. *Ernst Schering Res Found Workshop* 143-85.
- Serhan CN, Oliw E** 2001. Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J Clin Invest* 107:1481-9.
- Serhan CN, Takano T, Gronert K, Chiang N, Clish CB** 1999. Lipoxin and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin cellular interactions anti-inflammatory lipid mediators. *Clin Chem Lab Med.* 37(3):299-309
- Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R, Serhan CN** 2003a. COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 69(5):339-43
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P** 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(25):12013-7
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Isakson P** 1997. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol.* 400A:167-70
- Setton L A, Elliott D M, Mow V C** 1999. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis : human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Journal of the OA Res Soc Int.* 7:2-14
- Shannon SI, Graham RC** 1971. Protein uptake by synovial cells. I. Ultrastructural study on the fate of intraarticularly injected peroxidases. *J. Histochem. Cytochem.* 19:29-42
- Sharma L** 2003. Examination of exercise effects on knee osteoarthritis outcomes: Why should the local mechanical environment be considered? *Arthritis & Rheumatism* 49(2):255-260
- Shieh AC, Athanasiou KA** 2002. Biomechanics of single chondrocytes and osteoarthritis. *Crit Rev Biomed Eng.* 30(4-6):307-43
- Shinohara H, Balboa MA, Johnson CA, Balsinde J, Dennis EA** 1999. Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s. *J Biol Chem.* 274(18):12263-8
- Silverman ES, Drazen JM** 1999. The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc Assoc Am Physicians.* 111(6):525-36
- Simon LS** 1999a. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *American Journal of Medicine* 106 (5B):37S-42S
- Simon LS** 1999b. Osteoarthritis: a review. *Clin Cornerstone.* 2(2):26-37
- Simonet W Scott** 2002. Genetics of primary generalized osteoarthritis. *Molecular Genetics and Metabolism* 77:31-34
- Slater D, Allport V, Bennett P** 1998. Changes in the expression of the type-2 but not the type-1 cyclo-oxygenase enzyme in chorion-decidua with the onset of labour. *Br J Obstet Gynaecol.* 105(7):745-8

- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM** 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 69:145-82
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL** 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 271(52):33157-60
- Smith WL, Langenbach R** 2001. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest.* 107(12):1491-5
- Smith WL, Meade EA, DeWitt DL** 1994b. Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Ann N Y Acad Sci.* 744:50-7
- Sneddon JM, Vane JR** 1988. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(8):2800-4
- Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S** 2000. Lipoxin A₄ inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J Immunol.* 164:2660-2666
- Southwick WO, Bensch KG** 1971. Phagocytosis of colloidal gold by cells of synovial membrane. *J. Bone Joint Surg.* 53-A:729-41
- Spector TD, Hart DJ, Nandra D, Doyle DV, Mackillop N, Gallimore JR, Pepys MB** 1997. Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease. *Arthritis Rheum.* 40(4):723-7
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL** 1998. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem.* 273(16):9886-93
- Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH** 1991. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol.* 147(11): 3915-20
- Stefanovic-Racic M, Stadler J, Georgescu HI, Evans CH** 1994. Nitric oxide and energy production in articular chondrocytes. *J Cell Physiol.* 159(2): 274-80
- Stevens CR, Blake DR, Merry P, Revell PA, Levick JR** 1991. A comparative study by morphometry of the microvasculature in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 34(12):1508-13
- Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A** 2000. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Prog Lipid Res.* 39(4):289-314
- Suzuki T, Watanabe K, Kanaoka Y, Sato T, Hayaishi O** 1997. Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in human megakaryocytic cells by phorbol ester. *Biochem Biophys Res Commun.* 241(2):288-93
- Swann DA, Radin EL, Nazimie CM, Weisser PA, Curran N, Lewinnek G** 1974. Role of hyaluronic acid in joint lubrication. *Ann Rheum Dis* 33:318-26

T

Takahashi Y, Reddy GR, Ueda N, Yamamoto S, Arase S 1993. Arachidonate 12-lipoxygenase of platelet-type in human epidermal cells. *J Biol Chem.* 268(22):16443-8

Tegeder I, Neupert W, Guhring H, Geisslinger G 2000. Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther.* 292:1161-8

Teichtahl A, Wluka A, Cicuttini FM 2003. Abnormal biomechanics: a precursor or result of knee osteoarthritis? *Br J Sports Med* 37:289-290

Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C 1994. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 200(1):142-8

Tazawa R, Xu XM, Wu KK, Wang LH 1994. Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 203(1):190-9

Tonnesen MG, Anderson DC, Springer TA, Knedler A, Avdi N, Henson PM 1989. Adherence of neutrophils to cultured human microvascular endothelial cells. Stimulation by chemotactic peptides and lipid mediators and dependence upon the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family. *J Clin Invest.* 83(2):637-46

Tries S, Neupert W, Laufer S 2002. The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm Res.* 51(3):135-43

Tsai PF, Tak S 2003. Disease-specific pain measures for osteoarthritis of the knee or hip. *Geriatric Nursing* 24(2):106-9

Turnay J, Pfannmuller E, Lizarbe MA, Bertling WM, von der Mark K 1995. Collagen binding activity of recombinant and N-terminally modified annexin V (anchorin CII). *J Cell Biochem.* 58(2):208-20

Tyyni A, Karlsson J 2000. Biological treatment of joint cartilage damage. *Scand J Med Sci Sports* 10:249-65

U

Ueda N, Kaneko S, Yoshimoto T, Yamamoto S 1986. Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. *J Biol Chem.* 261(17):7982-8

Ukawa H, Yamakuni H, Kato S, Takeuchi K 1998. Effects of cyclooxygenase-2 selective and nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs on mucosal ulcerogenic and healing responses of the stomach. *Dig Dis Sci.* 43(9):2003-11

V

van de Loo F A, Joosten L A, van Lent P L, Arntz O J, van den Berg W B 1995. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 38(2):164-72

van den Berg WB 2000. Pathophysiology of osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 67:555-6

van der Kraan PM, van den Berg WB 2000. Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 3(3): 205-11

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:97-120

Velleman SG 2000. The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poultry Science* 79:985-89

W

Wallace JL, Bak A, McKnight W, Asfaha S, Sharkey KA, MacNaughton WK 1998. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology* 115(1): 101-9

Wallace JL, McKnight GW, Bell CJ 1995. Adaptation of rat gastric mucosa to aspirin requires mucosal contact. *Am J Physiol.* 268(1 Pt 1):G134-8

Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N 2000. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 119(3): 706-14

Walsh DA, Mapp PI, Wharton J, Polak JM, Blake DR 1993. Neuropeptide degrading enzymes in normal and inflamed human synovium. *Am J Pathol.* 142(5):1610-21.

Watanabe H, Yamada Y, Kimata K 1998. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem.* 124(4):687-93

Weissmann, G 1993. Prostaglandins as modulators rather than mediators of inflammation. *J Lipid Mediators* 6:275-86.

Westacott CI, Webb GR, Warnock MG, Sims JV, Elson CJ 1997. Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum.* 40(7):1282-91

Whitman S, Gezginci M, Timmermann BN, Holman TR 2002. Structure-activity relationship studies of nordihydroguaiaretic acid inhibitors toward soybean, 12-human, and 15-human lipooxygenase. *J Med Chem.* 45(12):2659-61

Whittle BJ, Oren-Wolman N, Guth PH 1985. Gastric vasoconstrictor actions of leukotriene C4, PGF2 alpha, and thromboxane mimetic U-46619 on rat submucosal microcirculation in vivo. *Am J Physiol.* 248:G580-6

Wilkinson LS, Edwards JCW 1989. Microvascular distribution in normal human synovium. *J Anatomy* 167:129-36

Y

Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF 1993. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*. 11(2):371-86

Yamamoto S 1992. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta*. 1128(2-3):117-31

Yao M, Lam EC, Kelly CR, Zhou W, Wolfe MM 2004. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 90(3):712-9

Yuan GH, Tanaka M, Masuko-Hongo K, Shibakawa A, Kato T, Nishioka K, Nakamura H 2004. Characterization of cells from pannus-like tissue over articular cartilage of advanced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 12(1):38-45

Yucel-Lindberg T, Ahola H, Carlstedt-Duke J, Modeer T 1999. Involvement of tyrosine kinases on cyclooxygenase expression and prostaglandin E2 production in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1beta and epidermal growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 257(2):528-32

Z

Zhang X, Morham SG, Langenbach R, Young DA, Xing L, Boyce BF, et al. 2001. Evidence for a direct role of cyclo-oxygenase 2 in implant wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res*. 16:660-670

Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ 2002 Cyclooxygenase2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest*. 109:1405-1415.

Zimmerman GA, McIntyre TM 1988. Neutrophil adherence to human endothelium in vitro occurs by CDw18 (Mo1, MAC-1/LFA-1/GP 150,95) glycoprotein-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest*. 81(2):531-7

LIVRES

B

Badr KF, Jacobson R « Arachidonic acid metabolism and the kidney » dans *The kidney, 4th edition*, PA Saunders, Philadelphia, 1990, p. 584-622

Bassleer R, Lhoest-Ganthier M-P, Renard A-M et al. « Histological structure and functions of synovium » dans *Articular synovium*, Basel, Karger, 1982, p. 1

Bjelle A « Age and aging in rheumatic disease » dans *Rheumatology*, London, Mosby, 1994, section 1, p. 15.1-15.6

Boskey AL « The musculoskeletal system : C. Bone » dans *Primer on the rheumatic diseases*, Georgia, Arthritis Foundation, 2001, p. 17-21

Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB et al. « Articular cartilage : Composition and structure » dans *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*, Park Ridge, IL, 1988, p. 405-425

C

Carola R, Harley JP, Noback CR « Bones and bone tissue » dans *Human anatomy*, USA, McGraw-Hill Inc., 1992, p. 128-143

D

Dequeker J « Metabolic bone diseases : Bone structure and function » dans *Rheumatology*, London, Mosby, 1994, section 7, p. 30.1-30.12

Dupuis M, Leclaire R *Pathologie de l'appareil locomoteur*, St-Hyacinthe, Edisem, 1986, 999p.

E

Edwards J « Rheumatoid arthritis : synovium » dans *Rheumatology*, London, Mosby, 1994, section 3, p. 7.1-7.8

F

Fassbender HG « Osteo-Arthritis » dans *Pathology of rheumatic disease*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 1975, p. 279-301

Fassbender HG « Inflammatory reactions in arthritis » dans *Immunopharmacology of joints and connective tissue*, London, Academic Press, 1994, 165-98

Fox RI, Kang H « Structure and function of synoviocytes » dans *Arthritis and allied conditions; twelfth edition vol. 1*, Malvern, Lea & Febiger, 1993, p.263-78

G

Ghadially FN « Fine structure of joints » dans *The joints and synovial fluid*, New York, New York Academic Press, 1978, p. 105-76

Ghadially FN *Fine structure of synovial joints*, London, Butterworths, 1983, p. 1-41

Goldring MB « The musculoskeletal system. B. Articular cartilage » dans *Primer on the rheumatic diseases*, Atlanta, Arthritis Foundation, 2001, p.10-16

H

Hasselbacher P « Joint physiology » dans *Rheumatology*, London, Mosby, 1994, section 1, p. 3.1-3.6

Henderson B, Edwards JCW « The synovial lining » dans *In health and disease*, London, Chapman and Hall, 1987, p. 17-40

M

Mankin HJ, Brandt KD « Pathogenesis of osteoarthritis » dans *Kelley's textbook of rheumatology, ed. 6 volume 2*, Philadelphia, WB Saunders, 2001, p. 1391-1407

Martel-Pelletier J, Di Battista J A, Lajeunesse D « Biochemical factors in joint articular tissue degradation in osteoarthritis » dans *Osteoarthritis : clinical and experimental aspects*, Berlin, Springer-Verlag, 1999, p. 156-87

Martel-Pelletier J, Pelletier J-P « Osteoarthritis » dans *Mechanisms in rheumatology*, Ontario, Core Health Services Inc., 2001

McCarty Daniel J, Koopman William J 1993. *Arthritis and allied conditions; twelfth edition vol. 1*, Lea & Febiger, Malvern, Pennsylvania, USA

O

Oates J C, Gilkeson G S « Mediators of inflammation, tissue destruction, and repair. E. Arachidonic acid derivatives, reactive oxygen species, and other mediators » dans *Primer on the rheumatic diseases, edition 12*, Atlanta, Arthritis Foundation, p.81-8

P

Pelletier J-P, Martel-Pelletier J « Articular cartilage » dans *Primer on the rheumatic diseases 10th edition*. Atlanta, Arthritis Foundation, 1993, 350p.

Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Howell D S « Etiopathogenesis of osteoarthritis » dans *Arthritis and allied condition : A textbook of rheumatology*, Philadelphia, Lippincott William & Wilkins, 2001b, 2195-2215

Poole AR « Cartilage in health and disease » dans *Arthritis and allied conditions; 13th edition*, Baltimore, Williams & Wilkins, 1997, p.255-308

R

Resnick D, Niwayama G « Articular anatomy and histology » dans *Diagnosis of bone and joint disorders; second edition*, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1988, p. 625-646

Robey GH, Shen LWF, Young MF, Termine JD « The biochemistry of bone » dans *Osteoporosis: Etiology, diagnosis and management*, New York, Raven Press, 1988, p. 95-109

Rodnan GP, Schumacher HR « Biology of the joint » dans *Primer on the rheumatic diseases 8th edition*, Atlanta, Arthritis Foundation, 1983

Rubin CT, Rubin JE « Disorders of bone and structural protein » dans *Kelley's textbook of rheumatology, sixth ed.*, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001, 1611-34

S

Simkin PA « Synovial physiology » dans *Arthritis and allied conditions; twelfth edition vol. 1*, Malvern, Lea & Febiger, 1993, p.199-212

Simkin PA « The musculoskeletal system » dans *Rheumatology*, London, Mosby, 1994, section 1,p. 2.1-2.10

Schumacher HR Jr, Klippel JH, Koopman WJ *Primer on the rheumatic diseases 10th edition*. Atlanta, Arthritis Foundation, 1993, 350p.

Sledge CB, Reddi AH, Walsh DA, Blake DR « Biology of the normal joint » dans *Kelley's textbook of rheumatology; sixth edition vol. 1*, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001, p. 1-26

Smith WL, Marnett LJ dans *Metal ion in biological systems*. Marcel Dekker, New York, 1994, p. 163-199

T

Thibodeau GA, Patton KT « Skeletal tissues » dans *Anatomy & physiology*, Missouri, Mosby, 2003, p. 189-205

W

Wasserman MA, Smith EF III, Underwood DC, Barnette MA « Pharmacology and pathophysiology of 5-lipoxygenase products » dans *Lipoxygenases and their products*, San Diego, Academic Press, 1991, p. 1-50

Wight TN, Heinegård, Hascall VC « Proteoglycans: Structure and function » dans *Cell biology of extracellular matrix, 2nd edition*, New York, Plenum Press, 1991, p. 45-78

Déclaration de l'étudiant concernant l'article

Pour l'article, j'ai effectué toutes les manipulations, c'est-à-dire : mise en culture des explants des membranes synoviales, stimulation des explants, immunobuvardages, RT-PCR et PCR quantitatif et dosages EIA sous la direction du Dr Pascal Reboul.

Patrick Marcouiller, 16 avril 2004