

2 M 11.3210.5

Université de Montréal

L'étude du «cross-talk» des voies de synthèse des prostaglandines E₂ et des leucotriènes B₁ dans le fonctionnement altéré des ostéoblastes sous-chondraux humains arthrosiques

Par
Kelitha Maxis

Département de Pharmacologie
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 Pharmacologie

Avril, 2004

© Kelitha Maxis 2004



W

4

U58

2004

v. 124

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.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé

L'étude du «cross-talk» des voies de synthèse des prostaglandines E_2 et des leucotriènes B_4 dans le fonctionnement altéré des ostéoblastes sous-chondraux humains arthrosiques

Présenté par :

Kelitha Maxis

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr John (Giovanni) Di Battista

Directeur de recherche : Dr Daniel Lajeunesse

Membre du jury : Dr Julio C. Fernandes

RÉSUMÉ

L'arthrose (OA) est la maladie dégénérative des articulations la plus diagnostiquée au monde. Elle se caractérise par une dégénérescence du cartilage et une sclérose de l'os sous-chondral. Néanmoins, sa pathogenèse est multifactorielle et complexe. De plus, son étiologie et sa progression sont encore mal comprises à ce jour. Les données récentes indiquent une participation active de l'os dans l'initiation et / ou dans la progression de cette pathologie. Plus spécifiquement, une altération phénotypique des ostéoblastes (Obs) OA semble être impliquée. Nous avons antérieurement identifié deux populations de patients OA en fonction de leur niveau de production variable et inverse (faible et élevé) de prostaglandine E_2 (PGE_2) et de leucotriène B_4 (LTB_4). De plus, un «court-circuit» vers la voie de production de LTB_4 lors d'une inhibition à long terme de la voie de production de prostaglandines semble se produire dans les Obs OA. Ces voies de synthèse semblaient donc communiquer entre elles chez les patients OA. Ainsi, l'hypothèse de travail était de déterminer ce qui régule ce «cross-talk» entre les voies de synthèse de PGE_2 et de LTB_4 dans les Obs de l'os sous-chondral humain chez des patients OA.

Nous avons utilisé un modèle de culture primaire d'Obs issus de la plaque sous-chondrale du plateau tibial de patients OA et d'individus normaux. Les cellules OA présentaient un phénotype ostéoblastique *in vitro* déterminé en fonction de leur production de phosphatase alcaline et d'ostéocalcine plus élevées que dans les Obs normaux. Les résultats de mes recherches ont indiqué que les effecteurs $1,25(OH)_2D_3$, TGF- β 1 et $1,25(OH)_2D_3$ + TGF- β 1 augmentaient de façon significative la production endogène de LTB_4 de 36 à 102% dans les Obs OA. L'expression de l'enzyme responsable de la synthèse des leucotriènes, la 5-lipoxygénase (5-LO), n'était pas perturbée chez les patients OA lorsque évalué par RT-PCR. Toutefois, l'expression de sa protéine associée, la 5-lipoxygénase-activating protein (FLAP), était perturbée. Ces niveaux d'expression variables de la FLAP avaient une relation directe mais inverse avec les niveaux de production de PGE_2 et discriminaient bien deux populations de patients OA: OA 1 (niveau de PGE_2 faible) et OA 2 (niveau de PGE_2 élevé). Dans un même

ordre d'idée, la régulation de l'expression de la FLAP aux effecteurs $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et/ou $\text{TGF-}\beta 1$ fut aussi altérée chez les patients OA en comparaison aux individus normaux. Plus spécifiquement, le $\text{TGF-}\beta 1$ stimulait faiblement l'expression de la FLAP dans les Obs OA des deux populations de patients OA. L'analyse de l'expression de la FLAP par PCR en temps réel en réponse au PGE_2 était diminué de $68.6\% \pm 26.6\%$ et était augmenté de $247.6\% \pm 143.3\%$ en réponse au NS-398 dans les Obs OA. L'existence d'un lien entre la production d'interleukine-10 (IL-10) et PGE_2 n'a pu être démontré en raison des niveaux très faibles d'IL-10 produits par les Obs normaux et OA. Par ailleurs, les Obs OA relâchaient légèrement plus d'interleukine-18 (IL-18) que les Obs normaux, et la population de patients qui produisent des niveaux plus élevés de PGE_2 (OA 2) relâchait plus d'IL-18.

Cette étude indique que les niveaux de LTB_4 variables dans les Obs OA sont dus à une expression variable de la FLAP, et non de la 5-LO. Cependant, l'absence d'outils de mesure fiable de la protéine FLAP rend difficile la confirmation de cette observation au niveau protéique. Cependant, puisque les variations d'expression suivent celle de la détection de LTB_4 , nous pouvons suggérer que la variation des niveaux protéiques doit suivre celle de l'expression. L'inhibition chronique de la production de PGE_2 par NS-398 induit une surexpression de la FLAP permettant d'expliquer les niveaux élevés de LTB_4 précédemment observés dans ces conditions. Le «court-circuit» via la voie de production des leucotriènes (LTs) ne peut s'expliquer par la production d'IL-10, mais pourrait être relié à celle du IL-18. Finalement, l'inhibition chronique de la synthèse de PGE_2 induisant une surexpression de la FLAP (et des LTs par le fait même) nous révèle qu'à long terme, l'inhibition sélective de la COX-2 puisse être néfaste pour les patients arthrosiques.

Mots clés : arthrose, os sous-chondral, ostéoblaste, 5-lipoxygénase (5-LO), 5-lipoxygénase-activating protein (FLAP), PGE_2 , LTB_4 , $\text{TGF-}\beta 1$ et IL-18.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most diagnosed degenerative joint disease worldwide. It is characterized by a progressive loss of articular cartilage accompanied by subchondral bone sclerosis. However, the pathogenesis of OA is multifactorial and complex. Moreover, the aetiology and progression of the disease are still unknown. Recent data have suggested an active participation of bone in the initiation and /or the progression of the pathology. More specifically, a phenotypical alteration of OA osteoblasts (Obs) seems to be implicated. Past results from our laboratory have identified two subpopulations of OA patients based on the variable and opposite levels (low and high) of prostaglandin E₂ (PGE₂) and leukotriene B₄ (LTB₄) produced. A shunt towards the LTB₄ production pathway in the case of long term inhibition of prostaglandins production seems to happen in OA Obs. Those last findings suggested a cross-talk between the two production pathways of PGE₂ and LTB₄. The main objective of my research is to determine the regulation of the cross-talk between the two production pathways of PGE₂ and LTB₄ in human subchondral OA Obs of OA patients.

To evaluate this hypothesis, we used a primary cell culture model of Obs isolated from the human subchondral bone plate of tibial plateaus of OA patients and normal individuals. OA cells presented an osteoblastic phenotype *in vitro* determined by their higher alkaline phosphatase activity and osteocalcin release than normal Obs. The results of my research project indicated that 1,25(OH)₂D₃, TGF-β1 and 1,25(OH)₂D₃ + TGF-β1 significantly increased the endogenous production of LTB₄ from 36 to 102% in OA Obs. Furthermore, the expression of the enzyme responsible for the synthesis of leukotrienes, 5-lipoxygenase (5-LO), was not altered in OA Obs as measured by RT-PCR. In contrast, the expression of its associated protein, 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP), was altered. These variables levels of expression of FLAP showed a direct but opposite relationship with the production of PGE₂, and these variables levels of expression of FLAP discriminated two subpopulations of OA patients: OA 1 (low producers of PGE₂) and OA 2 (high producers of PGE₂). Likewise, the regulation of FLAP expression by 1,25(OH)₂D₃ and/or TGF-β1 was also altered in OA patients in

comparison to normal individuals. Specifically, TGF- β 1 stimulated FLAP expression in OA Obs only slightly. The expression of FLAP, measured by real-time PCR, in response to PGE₂ was associated with a diminution of 68.6% \pm 26.6% whereas NS-398 treatment was associated with an increase of 247.6% \pm 143.3% in OA Obs. A link between the production of interleukin-10 (IL-10) and PGE₂ could not be shown since IL-10 levels were very low in both normal and OA Obs. In contrast, we discovered that the OA Obs released slightly more IL-18 in comparison to normal individuals, and that the OA subpopulation which produced the highest levels of PGE₂ (OA 2) released more IL-18.

This study indicates that variable levels of LTB₄ produced by OA Obs are linked to FLAP expression and not to 5-LO. However, the absence of adequate biological tools prevented us from confirming this hypothesis at the protein level. However, given the fact that variations in FLAP expression followed those of LTB₄ detection, suggests that protein levels must follow those of FLAP expression. Chronic inhibition of PGE₂ production by NS-398 induces an overexpression of FLAP that could explain the elevated LTB₄ levels previously observed under these conditions in OA Obs. The shunt via the leukotriene (LT) pathway cannot be explained by an increase in IL-10, but could be associated with IL-18 levels. Lastly, the chronic inhibition of PGE₂ synthesis that induces an overexpression of FLAP (and thereby of LTs) suggests that a long term inhibition of COX-2 could be harmful in OA patients.

Key words: osteoarthritis, subchondral bone, osteoblasts, 5-lipoxygenase (5-LO), 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP), PGE₂, LTB₄, TGF- β and IL-18.

TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
DÉDICACE	XVI
REMERCIEMENTS	XVII
INTRODUCTION	1
1. L'ARTHROSE	1
1.1 La pathogenèse	2
1.2 L'épidémiologie	6
1.3 Les facteurs de risque	7
1.3.1 Les facteurs de risque systémiques	10
1.3.1.1 Les facteurs nutritionnels	10
1.3.1.2 La prédisposition génétique	10
1.3.1.3 La densité minérale osseuse	11
1.3.2 Les facteurs de risque biomécaniques locaux	12
1.3.2.1 L'obésité	12
1.3.2.2 L'activité sportive	13
1.3.2.3 Les traumatismes articulaires précédents	14
2. LES PRINCIPAUX COMPOSANTS DES ARTICULATIONS	15
2.1 Le cartilage normal	18
2.1.1 Les types cellulaires du cartilage	19
2.2 Le cartilage arthrosique	19
2.3 L'os normal	20

2.3.1	Structure macroscopique de l'os	20
2.3.2	Structure microscopique de l'os	23
2.3.3	Les cellules osseuses	25
2.3.4	Le remodelage osseux	30
2.3.4.1	La régulation du remodelage osseux	32
2.3.4.2	Les facteurs systémiques	32
2.3.4.3	Les facteurs locaux	34
2.4	L'os sous-chondral arthrosique	36
2.4.1	Les caractéristiques générales	36
2.4.2	Les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques	37
2.5	Interactions entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire	40
3.	LES EICOSANOÏDES	42
3.1	Les prostaglandines (ou PGs)	42
3.1.1	Pharmacologie des enzymes de biosynthèse des PGs	45
3.1.2	Les prostaglandines E ₂ (ou PGE ₂)	46
3.2	Les leucotriènes (ou LTs)	47
3.2.1	La 5-lipoxygénase ou 5-LO	49
3.2.2	La 5-lipoxygénase-activating protein ou FLAP	49
3.2.3	Les leucotriènes B ₄ (ou LTB ₄)	52
4.	LES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES ACTUELLES	53
4.1	Les traitements pharmacologiques	53
4.1.1	Les traitements systémiques	53
4.1.1.1	Les AINS	53
4.1.1.2	Les COXIBS	55
4.1.1.3	Les nouveaux produits thérapeutiques	56
4.1.2	Les traitements locaux	59
4.2	Les traitements non-pharmacologiques	60

5. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	61
6. MATÉRIEL ET MÉTHODES	63
7. RÉSULTATS	70
8. DISCUSSION	88
9. CONCLUSION	99
10. RÉFÉRENCES	100

LISTE DES TABLEAUX**INTRODUCTION**

Tableau I : Caractéristiques des classes primaires et secondaires de l'OA	8
Tableau II : Variation des marqueurs métaboliques des ostéoblastes sous-chondraux OA	39
Tableau III : Action(s) physiologique(s) et/ou pathologique(s) spécifique(s) des prostanoides	44
Tableau IV : Les différentes classes d'AINS	54

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Articulation normale et arthrosique du genou	4
Figure 2 : Description des caractéristiques de l'articulation arthrosique du genou	4
Figure 3 : Caractéristiques morphologiques des sites articulaires modifiés.....	5
Figure 4 : Représentation des facteurs de risque systémiques et locaux connus de la pathogenèse de l'OA	9
Figure 5 : Caractéristiques structurales du cartilage articulaire normal	16
Figure 6 : Composition biochimique du cartilage articulaire	17
Figure 7 : Classification de l'os selon leur forme	22
Figure 8 : Structure macroscopique et microscopique d'un os long	22
Figure 9 : Structure microscopique de l'os compact	24
Figure 10 : Origine, différenciation des ostéoclastes et ses régulateurs	28
Figure 11 : Origine et différenciation des ostéoblastes	28
Figure 12 : Morphologie des cellules osseuses	29
Figure 13 : Cycle du remodelage osseux	31
Figure 14 : Phénotype modifié des ostéoblastes OA	39
Figure 15 : Biosynthèse des prostanoïdes et tissus impliqués	44
Figure 16 : Caractéristiques et rôles des enzymes COX-1 et COX-2	46
Figure 17 : Voie de biosynthèse des leucotriènes	48
Figure 18 : Modèle possible démontrant la relation existant entre 5-LO et FLAP ...	51

RÉSULTATS

Figure 19: Relâche d'ostéocalcine et activité enzymatique de l'ALPase des ostéoblastes sous-chondraux humains stimulés par 1,25(OH) ₂ D ₃ provenant de patients OA et d'individus normaux	79
Figure 20 : Niveaux de production endogènes de PGE ₂ dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE ₂ faible), OA 2 (niveau de PGE ₂ élevé) et d'individus normaux	80

Figure 21: Régulation du niveau de production de LTB ₄ dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA	81
Figure 22: Régulation du niveau d'expression de la 5-LO par des ostéoblastes sous-chondraux humains d'un patient OA	82
Figure 23: Régulation du niveau d'expression moyen de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE ₂ faible), de patients OA 2 (niveau de PGE ₂ élevé) et d'individus normaux	83
Figure 24: Régulation du niveau d'expression de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains d'un patient OA et d'un individu normal	84
Figure 25: PCR en temps réel démontrant la régulation du niveau d'expression moyen de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA et d'individus normaux	85
Figure 26: Niveaux de production endogènes de PGE ₂ et d'IL-18 dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE ₂ faible), OA 2 (niveau de PGE ₂ élevé) et d'individus normaux	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxy-vitamine D ₃
5-HPETE	5(S)-hydropéroxy-6,8,11,14-eicosatétraoïque
5-LO	5-Lipoxygénase
12-HETE	12-hydroxyeicosatétraoïque
A.A	Acide arachidonique
AC	Adénylate Cyclase
AGC-1	« Aggrecan-1 »
AINS	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens
ALPase	Phosphatase Alcaline
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
b-HLH-ZIP	« basic/helix-loop-helix/leucine zipper »
BMP	« Bone morphogenetic protein »
Cbfa1/Runx2	«Core binding factor A1»
CLASS	«Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study»
COX-1	Cyclooxygénase-1
COX-2	Cyclooxygénase-2
COXIBS	Inhibiteurs sélectifs de COX-2
CRTM	Protéine de la matrice cartilagineuse
CRTL	Protéine de liaison du cartilage
Ct	Calcitonine
DMO	Densité minérale osseuse
EIA	« Enzyme Immunoassay »
ELISA	«Enzyme Linked Immunosorbent Assay»
ER- α	Récepteur d'œstrogènes α
FDA	« Food and Drug Administration »

FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FLAP	« 5-Lipoxygenase activating-protein »
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase
GI	Gastrointestinal
GM-CSF	«Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor»
HA	Acide hyaluronique
IGF-1	Facteur de croissance insulinique de type 1
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IL-10	Interleukine-10
IL-18	Interleukine-18
IL-18BP	Interleukine-18 Binding Protein
INF- γ	Interféron- γ
IPs	Inositols Phosphates
LTA ₄	Leucotriène A ₄
LTs	Leucotriènes
LTB ₄	Leucotriène B ₄
LTBP	« Transforming growth factor- β binding protein »
LXs	Lipoxines
MAPEG	« Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathion metabolism »
M-CSF	« Macrophage-colony-stimulating factor »
MITf	« Microphthalmia-associated transcription factor »
NF κ B	Facteur de transcription nucléaire κ -B
OA	Arthrose
Obs	Ostéoblastes
OC	Ostéocalcine
OMS	Organisation mondiale de la santé
PGs	Prostaglandines
PGE ₂	Prostaglandine E ₂

PGHS	Prostaglandine G/H synthase
PGG ₂	Prostaglandine G ₂
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMN	Polymorphonucléaires
pNP	p-nitrophénol
pNPP	p-nitrophénylphosphate
PTH	Hormone parathyroïdienne
PU-1	Facteur de transcription Sp-1
RA	Arthrite Rhumatoïde
RE	Réticulum Endoplasmique
RANK	Récepteur activateur du NFκB
RANKL	Ligand du récepteur RANK
RT-PCR	«Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction»
TGF-β	« Transforming growth factor-β »
TXA ₂	Thromboxane A ₂
uPA/Plasmin	« urokinase plasminogen activator/Plasmin »
UNG	Uracyl-N-glycosylase
UV	Ultra-Violet
VDR	Récepteur nucléaire de la vitamine D
VIGOR	«Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research»

*« Je dédie ce mémoire à mon conjoint pour son soutien,
sa compréhension, ses multiples encouragements,
sa patience et, surtout, son amour inconditionnel.
Je te l'offre en témoignage de mon amour pour toi.
Je dédie également ce mémoire à ma famille (père, sœurs, etc.)
avec laquelle j'ai pu passer à travers tout moment difficile »*

De K. M.

REMERCIEMENTS

Avant tout, j'aimerais sincèrement remercier mon directeur de recherche, Dr Lajeunesse, pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire et pour m'avoir formé tout au long de mon projet de recherche. Plus précisément, je vous remercie de m'avoir transmis vos connaissances, votre intérêt et votre enthousiasme. Je vous remercie également pour votre grande disponibilité.

De plus, j'aimerais remercier Isabelle Aubry (collègue de laboratoire) et Aline Delalandre (assistante du laboratoire) pour leur disponibilité et leur occasionnel aide technique.

Finalement, je remercie toute l'unité de recherche en arthrose, plus particulièrement François Mineau et Changshan Geng pour leur expertise en « quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction » et les Drs Joanne Martel-Pelletier et Jean-Pierre Pelletier, les responsables de l'unité de recherche.



Les membres de l'équipe de recherche sur l'arthrose (de gauche à droite) : Luc Fortin, Julio Fernandes, Daniel Lajeunesse, Richard Leclau, Jean-Pierre Pelletier, Johanne Martel-Pelletier et Jean-Pierre Ravnauld (Dubuc, 1997)

INTRODUCTION

1. L'ARTHROSE

L'arthrose est ubiquitaire chez les humains et les autres vertébrés et a toujours existé à travers l'évolution. Les premières descriptions de l'arthrose (OA) remontent au XVIII^{ème} siècle; elle était décrite comme « arthrite sèche » ou « nodosités interphalangiennes distales ». Au XIX^{ème} siècle, elle était plutôt décrite comme « usure du cartilage ». Peu après, on lui ajoutait la notion de « prolifération ostéophytique » (Mazières *et al.* 2000). Depuis, plusieurs nouvelles descriptions ont été proposées. Parmi celles qui retiennent le plus notre attention, il y a celle du Dr Guise Vaillancourt (spécialiste en rhumatologie, professeur émérite de la faculté de médecine de l'Université de Montréal et membre d'honneur de la Société française de rhumatologie) qui, en 1990, a défini l'arthrose comme étant une « arthropathie non inflammatoire caractérisée par une destruction du cartilage associée à une prolifération osseuse au niveau des surfaces de l'articulation ». Il a également proposé plusieurs autres surnoms à cette pathologie: ostéoarthrite, arthrite hypertrophique ou arthrite dégénérative (Vaillancourt, G. 1990). Le terme « ostéo-arthrite » a été introduit par Sir Archibald E. Garrod dans les années 1890. Certains rhumatologues préfèrent le terme « ostéoarthrose » au terme « ostéoarthrite », car le terme ostéoarthrose reflète de façon prédominante la dégénérescence de la pathologie, tandis que le terme ostéoarthrite suggère que l'inflammation joue un rôle très important dans l'apparition de la maladie (Hinton *et al.* 2002 ; Niethard, 1999). L'association généralisée de l'inflammation à l'OA serait erronée si on considère que plusieurs patients qui présentaient constamment des caractéristiques radiographiques évidentes de l'OA ne manifestaient aucun symptôme de douleur (Hinton *et al.* 2002 ; Sowers, 2001). D'ailleurs, Hogue et Mersfelder ont estimé qu'approximativement la moitié des patients qui présentaient des caractéristiques radiographiques évidentes de l'OA ne manifestaient aucun symptôme de douleur (Hogue et Mersfelder, 2002). Cependant, dans les cas où l'inflammation est présente, elle constitue une composante considérable de la maladie (aspect qui sera discuté dans un chapitre un peu plus loin).

Lors d'une réunion en 1994, l'organisation mondiale de la santé (OMS) et l'*American Academy of Orthopaedic Surgeons* a aussi proposé une ébauche de définition qui englobe les principales facettes de la maladie: «l'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral (os sous-jacent au cartilage). Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs: génétiques, de développement, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuses conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte de cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale». (Mazières *et al.* 2000).

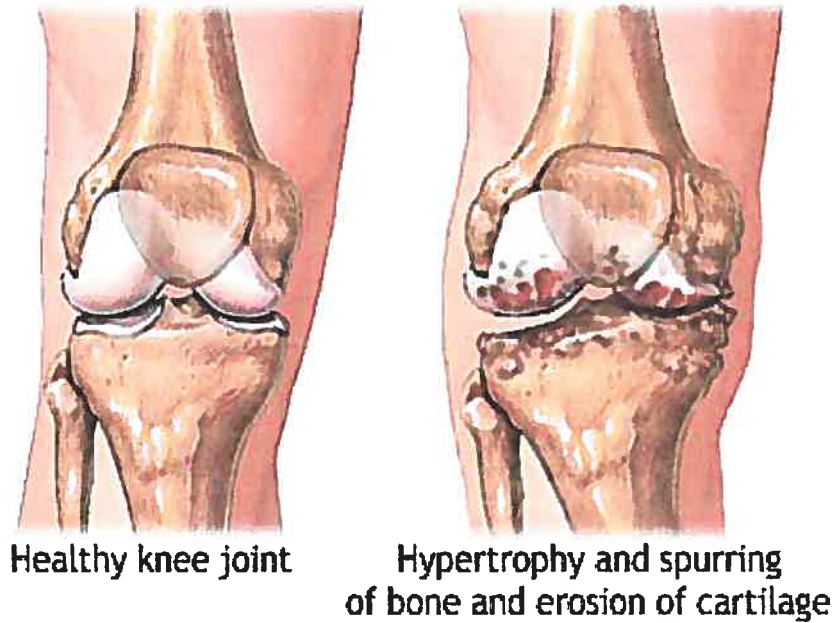
1.1 La pathogenèse

Pendant plusieurs années, l'OA a été considérée comme une maladie dégénérative qui était la conséquence inévitable du vieillissement et du traumatisme. Or, comme décrit précédemment dans la définition de l'OMS, la pathogenèse de l'OA est maintenant perçue comme une combinaison de phénomènes métaboliquement dynamiques: mécaniques, cellulaires et biochimiques. Il existerait donc plusieurs «niveaux» d'OA: l'OA purement métabolique ou biochimique, l'OA morphologique de l'anatomo-pathologiste, l'OA du radiologue, l'OA douloureuse du clinicien, etc. Ce qui est établi, c'est qu'à l'inverse des autres types d'arthrites (inflammatoires – arthrite rhumatoïde, infectieuses, métaboliques – goutte, etc.) qui sont d'abord et avant tout des affections inflammatoires, l'OA fait partie des maladies dégénératives. Et comme dans le cas de toutes les maladies dégénératives, l'OA est protéiforme dans sa présentation et multifactorielle dans son étiologie (Mazières *et al.* 2000).

En ce qui concerne les sites articulaires périphériques affectés, l'OA touche surtout les articulations qui soutiennent le poids corporel. Le genou (gonarthrose) représente l'atteinte la plus répandue (illustré dans les figures 1 et 2), suivie de la hanche (coxarthrose), puis des doigts (OA digitale) et des trois articulations du rachis (cervical, dorsal et lombaire). L'OA des autres sites (épaule, coude, poignet et cheville) constitue plutôt des conséquences secondaires à un ou plusieurs traumatismes antérieurs (Allanore et Hilliquin, 1999). Et d'un point de vue morphologique, les sites les plus largement modifiés dans l'apparition et / ou la progression de l'OA sont: le cartilage articulaire, l'os sous-chondral et, plus discrètement et tardivement, la membrane synoviale. Ces sites sont schématisés dans la figure 3. Le cartilage articulaire est un tissu d'origine conjonctive, résistant et élastique, recouvrant et protégeant l'os du glissement entre deux os. L'os sous-chondral est un tissu osseux localisé en dessous du cartilage servant d'amortisseur à l'articulation. La membrane synoviale est un tissu conjonctif nourricier, permettant l'homéostasie locale et produisant le liquide synovial (Allanore et Hilliquin, 1999). Ces structures seront discutées plus en profondeur dans la section 2.

Par conséquent, l'opinion prédominante à l'heure actuelle est que l'OA n'est pas une maladie, mais plutôt un syndrome (groupe d'affectations dégénératives articulaires) ou encore l'aboutissement ultime de diverses maladies touchant l'articulation (Mazières *et al.* 2000). L'ampleur de ce syndrome sera discutée dans la prochaine section.

Osteoarthritis



ADAM.

Figure 1 : Articulation normale et arthrosique d'un genou

Tiré du site : www.nlm.nih.gov/.../ency/imagepages/l7103.htm

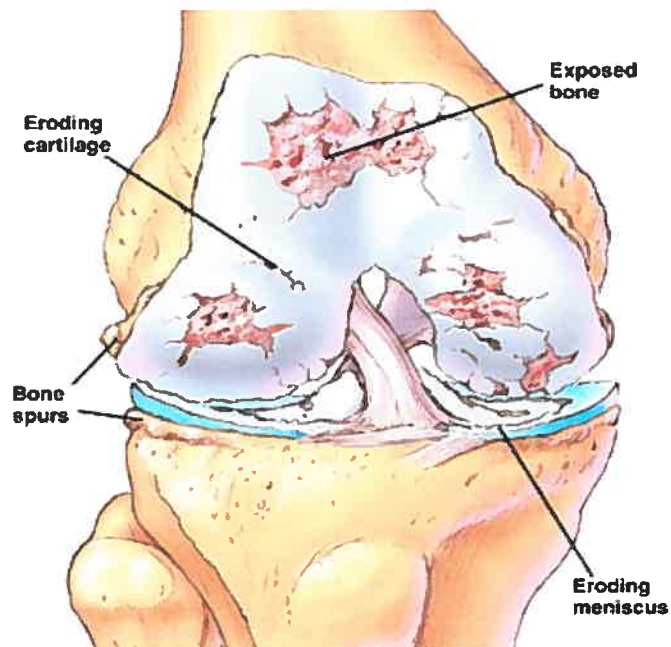


Figure 2 : Description des caractéristiques de l'articulation arthrosique du genou

Tiré du site : www.sulzerorthopedics.com/.../knee_osteoarthritis

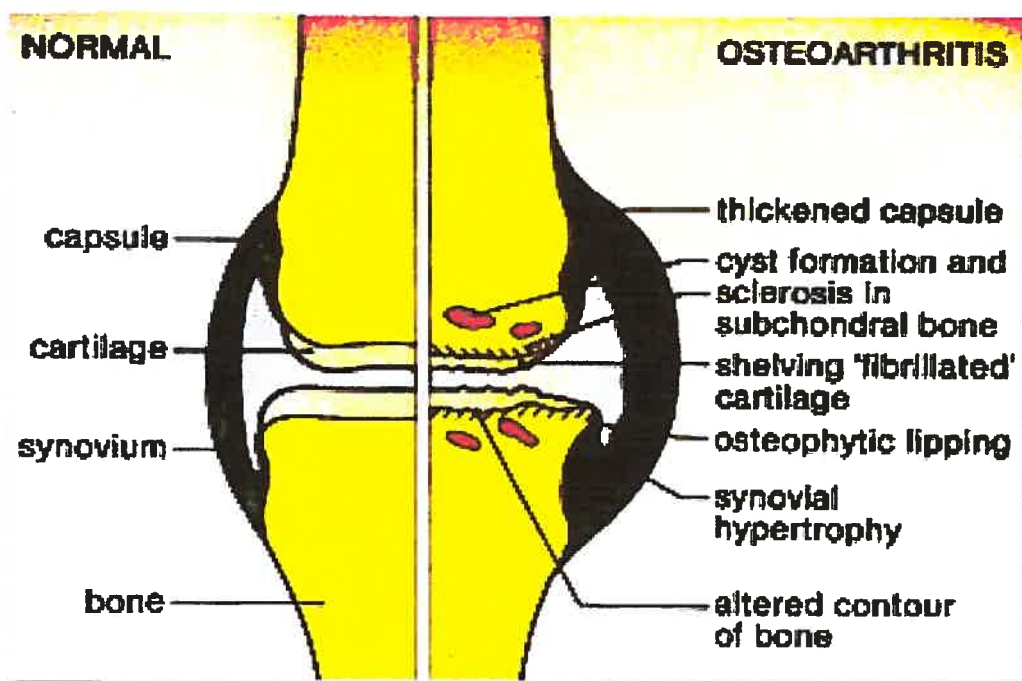


Figure 3 : Caractéristiques morphologiques des sites articulaires modifiés

Tiré du site: www.arthritiscenter.com/html/osteoarthritis.htm

1.2 L'épidémiologie

L'OA est la forme d'arthrite la plus fréquente aux Etats-Unis et la maladie des articulations du système musculo-squelettique la plus diagnostiquée au monde. On estime qu'entre 16 millions et 21 millions d'Américains sont atteints d'OA et que cette valeur augmentera à 40 millions en 2020 avec le vieillissement de la population (Hogues et Mersfelder, 2002). En ce qui concerne le Canada, plus de quatre millions de Canadiens souffrent d'arthrite. Plus spécifiquement, environ 2 930 000 Canadiens souffrent d'arthrose, c'est-à-dire environ un Canadien sur dix (La Société d'arthrite du Canada, Arthroscopie 2003). De plus, l'arthrite se classe parmi les 3 maladies chroniques les plus répandues au Canada avec le rhume des foins, les allergies et les affections circulatoires telles que les maladies du cœur et l'hypertension artérielle (La Société d'arthrite du Canada, Arthroscopie 2003). L'augmentation rapide du nombre de personnes souffrant d'arthrite se traduit par 100 000 nouveaux cas par année (soit 8000 par mois, 2000 par semaine ou encore 300 par jour). La Société d'arthrite du Canada estime même que le nombre de personnes atteintes d'arthrite au Canada augmentera au rythme d'un million par décennie et ce, au moins jusqu'en 2031 (La Société d'arthrite du Canada, Arthroscopie 2003). De façon globale, il a été estimé que 15% de la population mondiale souffre d'OA et, de ce nombre, approximativement 60% de cette population est âgée de 60 ans et plus (Martel-Pelletier et Pelletier, 2003). On peut donc considérer l'OA comme un problème médical majeur dans notre société.

Dans la plupart des cas, l'OA survient après l'âge de 45 ans, cependant elle peut se déclarer à n'importe quel âge (La Société d'arthrite du Canada, Arthroscopie 2003). Plus précisément, il semblerait que 70% des arthroses surviennent après l'âge de 50 ans (Allanore et Hilliquin, 1999). Par ailleurs, des études radiologiques ont dévoilé que la maladie est présente chez presque toutes les personnes âgées de 65 ans et plus (Niethard, 1999). Sa prévalence augmente donc très nettement avec l'âge, bien que ce dernier constitue un facteur indépendant de la pathologie. De plus, il a été constaté que l'homme est plus souvent affecté que la femme jusqu'à la cinquantaine et ce, pour la plupart des articulations (Felson, 2000). Néanmoins, au-delà de l'âge de la ménopause, la

fréquence est plus élevée chez la femme en ce qui concerne les articulations du genou, de la main et du pied (Felson, 2000).

1.3 Les facteurs de risque

L'OA est une pathologie complexe et son étiologie demeure encore inconnue à ce jour. Elle est habituellement classifiée selon deux catégories qui sont décrites dans le tableau I: primaire (idiopathique) et secondaire (Haq *et al.* 2003; Niethard, 1999). L'OA primaire est caractérisée par l'absence d'un facteur prédisposant connu: pas de défaut héréditaire, pas de défaut métabolique et endocrinien et pas d'antécédents de traumatismes ou de blessures. L'OA secondaire est majoritairement caractérisée par des désordres mécaniques de l'articulation: traumatismes ou blessures, infections, désordres métaboliques (obésité), etc. (Haq *et al.* 2003; Niethard, 1999). Ces facteurs systémiques (ou généralisés) et biomécaniques locaux engendrent donc un stress sur l'articulation et il serait important de connaître les facteurs de risque susceptibles d'induire ou de favoriser l'apparition de la maladie. Ces facteurs sont énumérés dans la figure 4 (Felson, 2000). Dans les facteurs de risque systémiques, on y retrouve: l'âge, le sexe, la prédisposition génétique, certains nutriments de l'alimentation, l'utilisation d'œstrogènes et la densité osseuse. Dans les facteurs de risque biomécaniques locaux, il y a: l'obésité (ou la surcharge pondérale), un ou des ancien(s) traumatisme(s) articulaire(s), une déformation de l'articulation, le sport ou le niveau d'activité physique et une faiblesse musculaire (Felson, 2000; Leslie, 2000; Sowers, 2001; Allanore et Hilliquin, 1999).

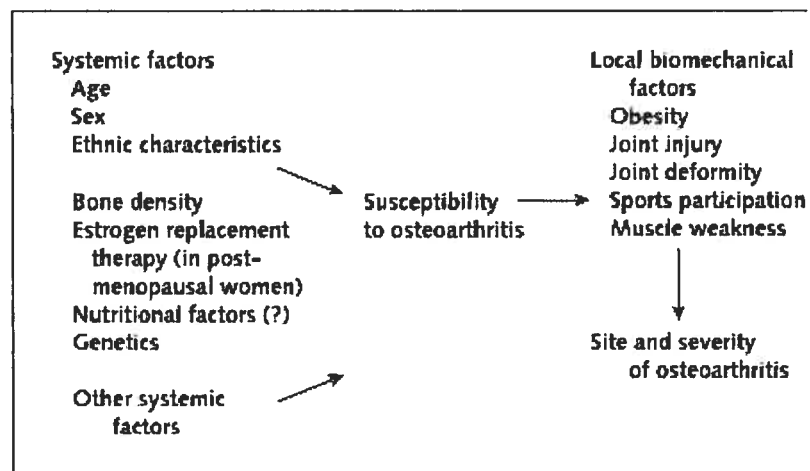
Tout d'abord, il a été constaté que les facteurs de risque diffèrent selon l'articulation touchée. Par exemple, des études ont révélé que l'OA du genou et de la hanche peut être associée à des facteurs de risques différents, il est donc suggéré de les considérer comme des maladies distinctes (Felson, 2000). Comme le genou est le site articulaire le plus largement atteint et que notre laboratoire a étudié l'OA sur cette articulation, on va se focaliser sur les principaux facteurs de risque de cette articulation.

Tableau I : Caractéristiques des classes primaires et secondaires de l'OA *

Table 1. CLASSIFICATION OF OSTEOARTHRITIS	
Primary (idiopathic)	
Peripheral joints (single versus multiple joints)	
Interphalangeal joints (nodal) (e.g., DIP, PIP)	
Other small joints (e.g., first CMC, first MTP)	
Large joints (e.g., hip, knee)	
Spine	
Apophyseal joints	
Intervertebral joints	
Variant subsets	
Erosive inflammatory osteoarthritis (EOA)	
Generalized osteoarthritis (GOA)	
Chondromalacia patellae	
Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH, ankylosing hyperostosis)	
Secondary	
Trauma	
Acute	
Chronic (occupational, sports, obesity)	
Other joint disorders	
Local (fracture, avascular necrosis, infection)	
Diffuse (rheumatoid arthritis, hypermobility syndrome, hemorrhagic diatheses)	
Systemic metabolic disease	
Ochronosis (alkaptonuria)	
Hemochromatosis	
Wilson's disease	
Kashin-Beck disease	
Endocrine disorders	
Acromegaly	
Hyperparathyroidism	
Diabetes mellitus	
Calcium crystal deposition diseases	
Calcium pyrophosphate dihydrate	
Calcium apatite	
Neuropathic disorders (Charcot joints) (e.g., tabes dorsalis, diabetes mellitus, intraarticular steroid overuse)	
Bone dysplasias (multiple epiphyseal dysplasia, spondyloepiphyseal dysplasia)	
Miscellaneous	
Frostbite	
Long-leg arthropathy	

Abbreviations: DIP = Distal interphalangeal joint; CMC = carpometacarpal joint; MTP = metatarsophalangeal joint; PIP = proximal interphalangeal joint.

* (Moskowitz *et al.* 1992)



Modified with permission from Figure 1 of Dieppe P. The classification and diagnosis of osteoarthritis. In: Kuettner K, Goldberg V, eds. Osteoarthritic Disorders. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1995:7.

Figure 4 : Représentation des facteurs de risques systémiques et locaux connus de la pathogenèse de l'OA ^(Felson, 2000)

1.3.1 Les facteurs de risque systémiques (ou généralisés)

1.3.1.1 Les facteurs nutritionnels

Puisque la génération de radicaux libres a été reconnue comme un agent potentiel de la destruction du cartilage et des tissus associés, une attention particulière a été portée vers l'utilisation des antioxydants (vitamines A, C et E) afin de prévenir et/ou de soulager la douleur et l'invalidité (Sowers, 2001). La vitamine D est une vitamine additionnelle nécessaire au métabolisme osseux normal (par son activité de minéralisation osseuse et de différenciation cellulaire) et un déficit de son niveau dans le sang pourrait perturber la faculté de l'os de répondre de façon optimale aux changements métaboliques associés à l'OA et prédisposer à une progression de la pathologie (Sowers, 2001). Les études longitudinales de Framingham du genou OA ont démontré que les personnes qui étaient dans la catégorie de faible consommation de vitamine C et D avaient approximativement trois fois plus de risque que leur OA progresse comparativement aux catégories de consommation élevée (Felson, 2000; Hinton *et al.* 2002; Haq *et al.* 2003). Par ailleurs, les personnes de la catégorie de consommation élevée de vitamine C ont révélé un risque réduit de douleur au genou pendant la durée de l'étude (Felson, 2000). Il y a malheureusement très peu d'études sur les effets de la vitamine E sur l'OA.

1.3.1.2 La prédisposition génétique

Les formes hétérogènes de l'OA (primaires ou secondaires) semblent être fortement génétiquement déterminées. Les facteurs génétiques représentent 50% des cas d'OA des articulations de la main et de la hanche, mais seulement un faible pourcentage des cas est relié à l'articulation du genou (Felson, 2000). Les preuves d'influence génétique de l'OA proviennent de plusieurs sources, incluant les études épidémiologiques d'antécédents familiaux, les études de jumeaux et les études de désordres génétiques rares. Une des considérations importantes à faire dans ces études est que les gènes peuvent se manifester différemment dans les deux sexes et dans les

sites corporels. Comme par exemple, certains gènes peuvent être activés dans l'os et non dans le cartilage. De ce fait, chaque tissu doit être examiné séparément pour permettre la détermination valide de liaisons génétiques (Spector et MacGregor, 2004). Il a également été constaté que l'héritabilité semble être plus élevée chez la femme. D'ailleurs, des études de jumeaux ont indiqué que l'influence de facteurs génétiques de l'OA radiographique du genou est de 65% chez la femme (Spector et MacGregor, 2004). De plus, des études de liaisons chromosomiques ont permis de démontrer des implications quantitatives de région de locus sur les chromosomes 2q, 9q, 11q et 16p, etc. Les gènes candidats associés à ces dernières études comprennent les gènes du AGC-1 (ou «aggrecan-1»), du «insulin growth factor-1» (ou IGF-1), de l'«oestrogen receptor- α » (ou ER- α), du «cartilage matrix protein» (ou CRTM), du «cartilage link protein» (ou CRTL), du «transforming growth factor- β » (ou TGF- β), du «vitamin D nuclear receptor» (ou VDR), etc (Spector et MacGregor, 2004). Une constatation intéressante est que le gène qui a été découvert le plus souvent est celui du VDR, bien qu'il n'a pas encore été observé dans les études de liaisons chromosomiques de familles ciblées. Néanmoins, un chercheur du nom de R. W. Keen a démontré une association entre un polymorphisme du locus du récepteur de la vitamine D sur le chromosome 12 et le développement rapide d'une OA du genou chez la femme (Keen *et al.* 1997). Comme il a été mentionné dans la section 1.3.1.1 que la vitamine D est associée à un risque de progression de l'OA du genou, il serait donc intéressant et important de trouver le gène en question. Ceci amènerait probablement à des progrès importants dans le traitement des patients affectés par ce polymorphisme, soit par une thérapie génique de remplacement par exemple (Mattei et Roux, 1999).

1.3.1.3 La densité minérale osseuse

La majorité des études effectuées sur la densité minérale osseuse (DMO) des patients atteints d'OA ont démontré une relation inverse entre le risque d'OA et la DMO (plus particulièrement celle de l'os sous-chondral) (Felson, 2000; Sowers, 2001; Hunter *et al.* 2002; Haq *et al.* 2003). Parmi ces études, il y a l'étude longitudinale de

femmes en pré-ménopause et en post-ménopause pour lesquelles on observait une OA radiographique du genou (Felson, 2000). Ces dernières ont présenté une susceptibilité beaucoup plus faible de perte osseuse durant les trois années de suivi que les femmes pour lesquelles on observait pas d'OA radiographique. Une autre étude basée sur une population de femmes blanches âgées de 28 à 48 ans a démontré que l'OA du genou est associée à une DMO plus élevée et cette dernière observation corrélait avec les observations effectuées sur des populations plus âgées ou sur des populations qui présentaient les signes cliniques (Sowers, 2001). L'existence de ces études a permis d'établir que les femmes atteintes d'OA du genou semblent posséder une DMO relativement élevée. Bien que la DMO augmente le risque d'OA du genou, un rapport de l'étude Framingham a révélé qu'il pourrait protéger l'articulation contre une progression de la maladie, une fois que celle-ci est déjà établie (Felson, 2000). D'ailleurs, la perte de DMO chez des personnes avec une OA du genou établie pourrait accélérer le risque de la progression de la maladie (Felson, 2000).

1.3.2 Les facteurs de risques biomécaniques locaux

1.3.2.1 L'obésité

L'obésité est le premier facteur de risque modifiable le plus important pour le développement de l'OA (Hunter *et al.* 2002). L'association de l'obésité avec l'OA du genou est plus élevée dans le cas de pathologies bilatérales qu'unilatérales, elle est également plus prononcée chez la femme que chez l'homme (Sowers, 2001). Pendant plusieurs années, il y a eu une confusion à savoir si l'obésité précédait ou était la conséquence de l'OA (à cause de l'immobilité et de l'invalidité que la maladie engendre). Des études récentes ont démontré que l'obésité précède le développement de la maladie (Felson, 2000). L'obésité augmente le risque de progression radiographique par contre, la perte de poids chez les personnes obèses atteintes d'OA peut réduire le risque d'OA. Par exemple, dans une étude observationnelle de Framingham, des femmes ayant perdu en moyenne 11 livres ont diminué leur risque d'OA du genou de 50% (Felson, 2000; La Société d'Arthrite du Canada, Arthroscopie 2003). Cet avantage de perte de poids a

également été observé dans une petite étude randomisée d'essai clinique d'un inhibiteur d'appétit où la quantité de perte de poids corrélait avec le soulagement des symptômes et des signes cliniques de la pathologie (Felson, 2000). Il faut considérer qu'un poids de 3 à 6 fois la masse corporelle est transféré sur l'articulation du genou pendant la marche (Haq *et al.* 2003). Autrement dit, la force globale appliquée sur le genou d'une seule jambe augmente de 2 à 3 livres lors d'une augmentation d'une livre en poids corporel. Cependant, une étude de Mokassa *et al.* (1993) sur le profil de minéralisation de l'os trabéculaire a indiqué que bien qu'il existe une relation positive entre l'obésité et l'OA, il existerait des effets inverses entre l'obésité et la qualité osseuse, c'est-à-dire que les obèses présentent un profil plus faible de densité de minéralisation (Mokassa *et al.* 1993). De plus, il existe des indices métaboliques liés à l'obésité qui influencent l'OA, tels que l'insuline, etc. Ainsi, l'obésité propose plusieurs implications possibles dans la maladie de l'OA et ce sont probablement ces implications qui ont permis de l'établir comme facteur de risque.

1.3.2.2 L'activité sportive

Des études épidémiologiques ont démontré que la participation à certains sports compétitifs augmente le risque d'OA (Felson, 2000). Les activités sportives qui semblent augmenter le risque d'OA incluent celles requérant une haute intensité, une intensité aigue et un impact direct aux articulations lors de contact avec d'autres participants ou avec des surfaces ou avec des équipements. Des exemples de ces activités sont le football (le genou), le soccer (le genou), le baseball (le coude), etc. (Felson, 2000). À l'inverse, il est bien reconnu que la faiblesse musculaire du quadriceps est commune chez des patients avec OA du genou. Les études longitudinales suggèrent qu'en plus d'engendrer une douleur aux genoux due à une OA, cette faiblesse musculaire du quadriceps constitue un facteur de risque pour des dommages structuraux à l'articulation (Felson, 2000). Ceci se produit par la diminution de la stabilité de l'articulation et par la réduction des propriétés d'absorption de choc du muscle (Haq *et al.* 2003).

1.3.2.3 Les traumatismes articulaires précédents

Bien que la relation existant entre un traumatisme articulaire aigu et le développement d'une OA post-traumatique soit incomprise, il est clair que des fractures de la surface articulaire, des dislocations articulaires, des ruptures de ligaments ou de ménisques augmentent le risque de développement d'OA post-traumatique (Felson, 2000; La Société d'Arthrite du Canada, Arthroscopie 2003). L'étude de Framingham a permis de remarquer que des hommes avec des antécédents de traumatismes du genou possèdent 5 à 6 fois plus de risque de développer l'OA (Haq *et al.* 2003). D'ailleurs, les blessures ou traumatismes articulaires du genou ont été identifiés comme le premier facteur de risque modifiable le plus important pour une OA secondaire chez l'homme (et le deuxième, chez la femme) (Hunter *et al.* 2002).

2. LES PRINCIPAUX COMPOSANTS DES ARTICULATIONS

L'articulation humaine possède des rôles bien spécifiques comme par exemple, la liberté de mouvement ou de glissement sans douleur qui serait attribuable au contact de la surface articulaire opposée, la répartition adéquate du poids appliqué sur les tissus articulaires et le maintien d'une stabilité pendant le mouvement (Moskowitz *et al.* 1992). Les articulations humaines sont composées de différents tissus : le cartilage, le cartilage calcifié, l'os (sous-chondral et trabéculaire), la membrane synoviale ou la synovie et les ligaments. Tous ces tissus sont importants pour le fonctionnement normal de l'articulation. Néanmoins, le cartilage et/ou l'os sont les structures les plus étudiées afin de découvrir l'étiologie de la pathologie de l'OA. Plus précisément (bien que le cartilage demeure un important site affecté par la pathologie), l'os a été reconnu comme étant, de façon incontestable, intimement impliqué dans l'initiation et la progression de l'OA (Burr, 2004). Par ailleurs, il a été confirmé que l'os sous-chondral représente l'élément structural le plus important dans l'apparition de la douleur (Dieppe, 1999) et comme la douleur constitue un symptôme difficile et dispendieux à gérer pour les patients impliqués, le choix de notre laboratoire s'est donc arrêté sur ce composant morphologique (l'os sous-chondral) quant à l'étude de cette maladie. Dans cette section, un survol structural et fonctionnel du cartilage et de l'os (sous-chondral) sera effectué afin de comprendre l'OA et ce qui s'y passe.

Structure of Articular Cartilage

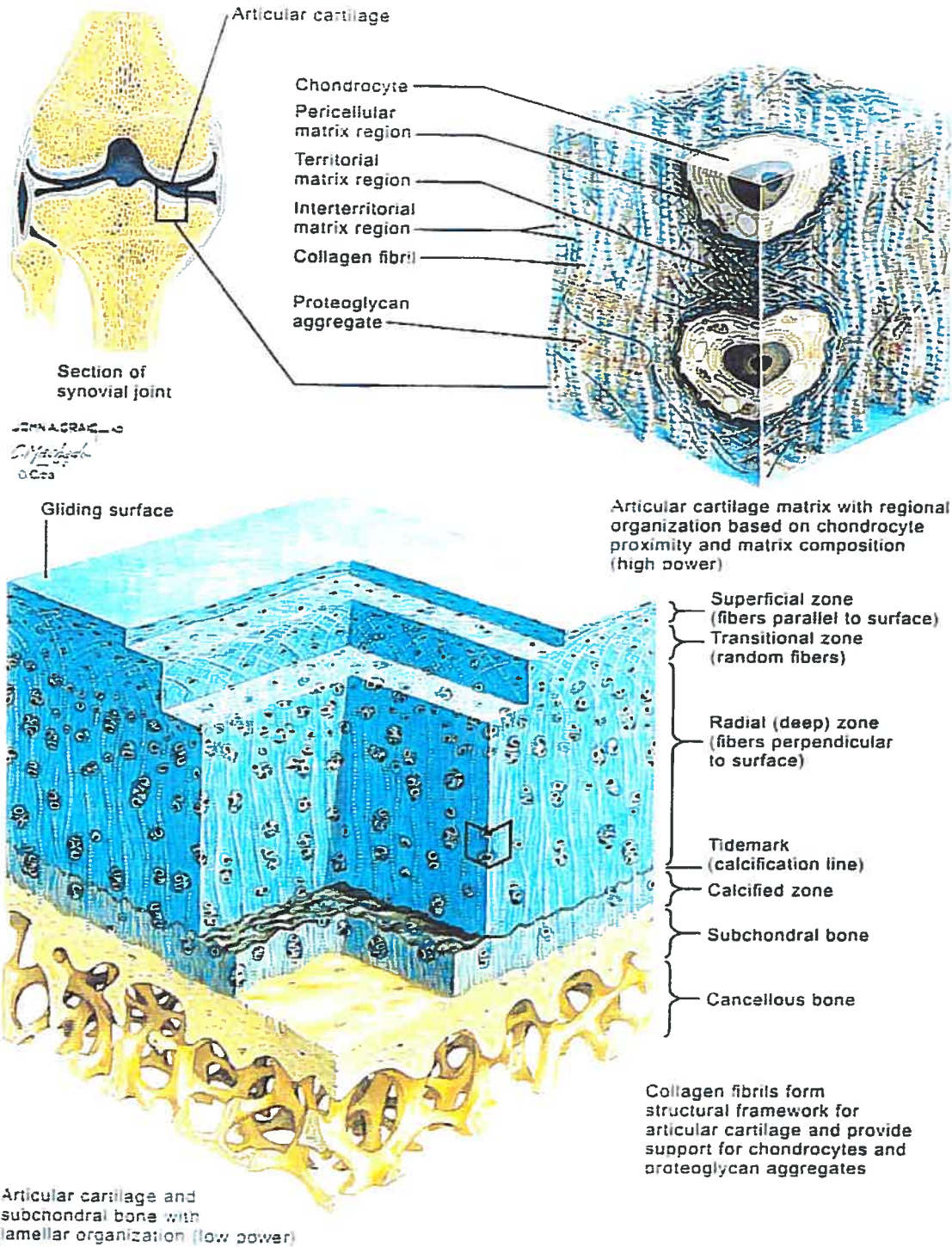
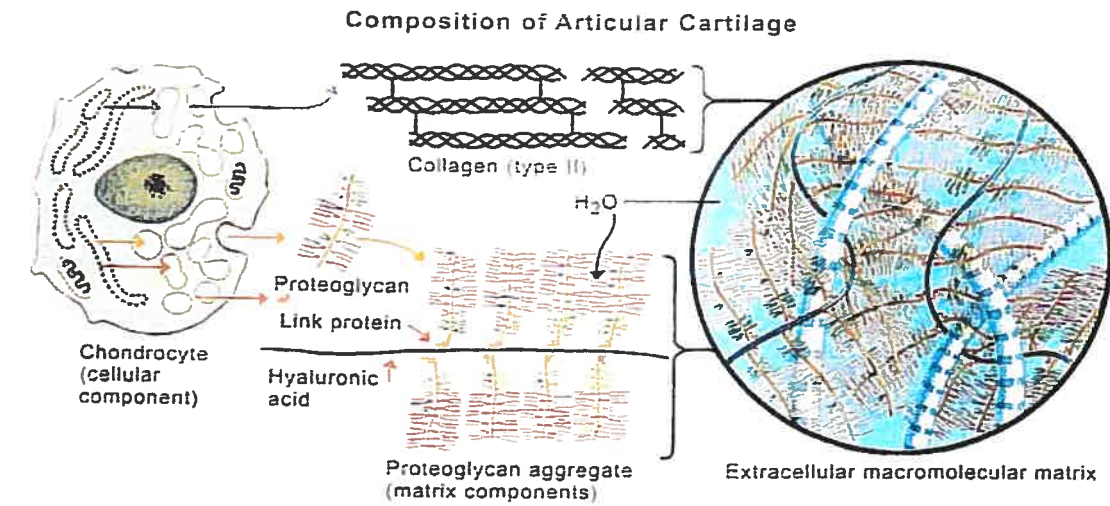
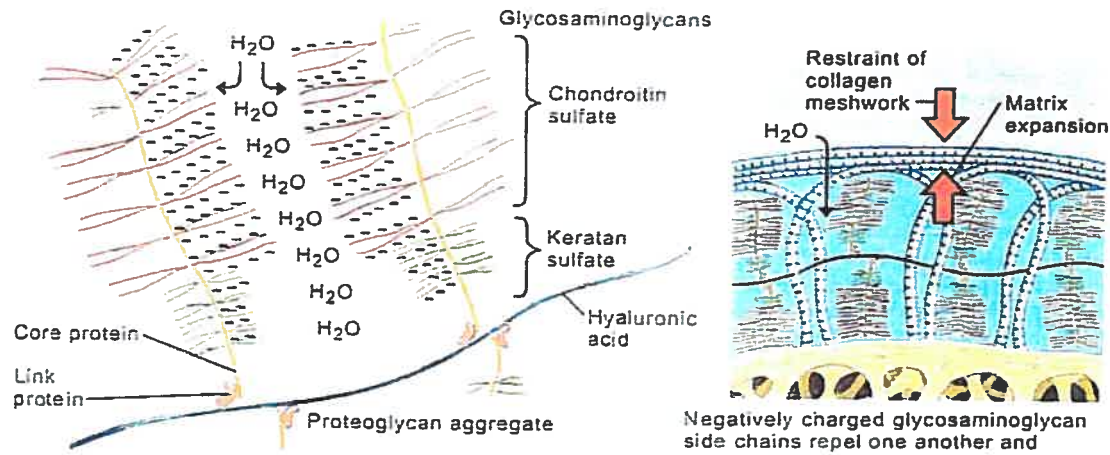


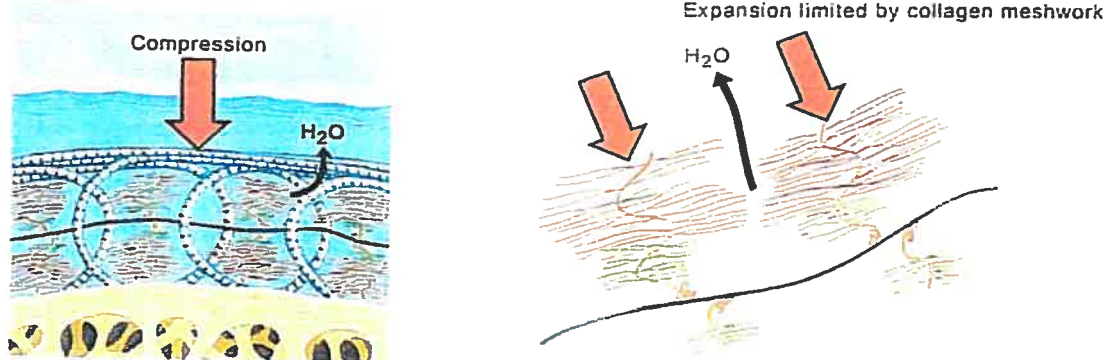
Figure 5 : Caractéristiques structurales du cartilage articulaire normal



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



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



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

© 2004 Ciba

Figure 6 : Composition biochimique du cartilage articulaire

2.1 Le cartilage normal

Le cartilage articulaire a toujours été reconnu comme un tissu hyalin spécialisé d'origine conjonctive, avasculaire, aneural et alymphatique (Allanore et Hilliquin, 1999). Néanmoins, quelques-unes de ces caractéristiques (avascluarisation, etc.) sont de plus en plus contestées, comme par exemple dans le processus de formation osseuse endochondrale, il semble y avoir une invasion des capillaires dans le cartilage calcifié (tissu qui était originalement avasculaire) et cette vascularisation semble être plus importante dans l'OA (Ortega *et al.* 2003; Burr, 2004). Le cartilage articulaire constitue une matrice extracellulaire complexe composée de 75 à 80% d'eau, moins de 1 à 2% de cellules (chondrocytes) et de 20 à 25% d'autres molécules comme des collagènes, des protéines non-collagèneuses et des protéoglycanes (Hogue et Mersfelder, 2002). Le collagène de type II est le type de collagène principal et spécifique du cartilage (95% des collagènes du cartilage normal) et il est caractérisé structurellement d'une grosse fibre de trois chaînes $\alpha 1$ organisée en triple hélice. Les molécules de protéoglycanes sont des énormes glycoprotéines insérées à l'intérieur des mailles du réseau de fibres de collagènes de type II, donnant au cartilage son épaisseur et son élasticité (Moskowitz *et al.* 1992). Ces fibres de collagène forment avec les molécules de protéoglycanes hydrophiles la matrice cartilagineuse dont les caractéristiques hydrophiles permettent de retenir l'eau (composant principal de la matrice). C'est d'ailleurs cette haute rétention d'eau qui confère au cartilage ses propriétés de résistance aux fortes pressions et d'élasticité. La structure et la composition du cartilage, précédemment décrites, sont présentées dans les figures 5 et 6.

La description du cartilage comme un tissu protecteur peu dynamique qui dépendrait exclusivement du liquide synovial pour s'approvisionner en nutriments est de plus en plus contesté car des travaux récents démontrent que l'os sous-chondral participe à ce mécanisme (Sokoloff, 1993). La nature de cet aspect reste donc à être clarifiée par les études à venir.

2.1.1 Les types cellulaires du cartilage

Les cellules cartilagineuses sont appelées des chondrocytes. Ils constituent le seul type cellulaire du cartilage et sont responsables de la synthèse, du renouvellement et du maintien de la matrice extracellulaire (Moskowitz *et al.* 1992). En d'autres termes, ils contrôlent l'homéostasie du tissu. Ces cellules possèdent une activité métabolique intense et peuvent être régulées par des facteurs de croissance et des cytokines (Hogue et Mersfelder, 2002). Leurs caractéristiques structurales et leur composition sont présentées dans les figures 5 et 6.

2.2 Le cartilage arthrosique

Encore aujourd'hui, la dégénérescence et la perte de cartilage représentent les caractérisations «classiques» de l'OA. Ces changements dégénératifs sont généralement issus de processus très longs qui se prolongent jusqu'à 15 ou 20 ans (Poole, 1999). Plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que le remodelage interne continu du cartilage par l'action des chondrocytes (c'est-à-dire le remplacement de la perte des macromolécules lors des processus de dégradation) serait altéré et que cette altération engendrerait ensuite des changements dégénérescents et une atteinte du processus de régénération et de réparation (Hinton *et al.* 2002 ; Hogue et Mersfelder, 2002). En d'autres termes, l'atteinte des processus responsables du maintien de l'homéostasie du tissu serait à l'origine de cette perte de cartilage.

Ces hypothèses sur les changements structuraux du cartilage articulaire, impliqueraient, initialement, une désorganisation du réseau de fibres de collagène : les fibres de collagène de type II se retrouveraient dans l'incapacité de retenir les molécules de protéoglycanes ou de glycosaminoglycanes nécessaires à la formation et à la stabilisation de la matrice cartilagineuse. Ensuite, le stress appliqué à l'articulation par des facteurs biochimiques, génétiques ou mécaniques bloquerait les interactions entre les chondrocytes et les autres composantes de la matrice extracellulaire. Finalement, ce blocage entraînerait l'altération des réponses métaboliques normales des chondrocytes

(Hogues et Mersfelder, 2002). Lors de cette dernière étape, il arrive que la synthèse de cytokines cataboliques (comme oxyde nitrique, prostaglandines, métalloprotéases matricielles, etc.) augmente. Ces produits entraîneraient donc l'amplification de la dégradation des molécules de collagènes et des autres molécules composant la matrice cartilagineuse, ainsi que l'inhibition des processus de réparation par l'oxyde nitrique (Hogues et Mersfelder, 2002). En conséquence, la dégradation du cartilage résulterait en un déséquilibre entre la balance de synthèse et de dégradation de la matrice (Allanore et Hilliquin, 1999).

2.3 L'os normal

L'os est un tissu conjonctif rigide et spécialisé qui possède trois rôles généraux : mécanique (de soutien et de site de liaison du muscle pour la locomotion), protecteur (pour les organes vitaux et la moelle osseuse) et métabolique (comme réserve d'ions pour le maintien de l'homéostasie du sérum) (Baron, 2003). Dans la composition osseuse, les constituants fondamentaux sont les cellules et la matrice extracellulaire. Tout comme le cartilage, cette matrice est aussi composée de fibres de collagène (principalement de type I: molécule de triple hélice contenant deux chaînes identiques $\alpha 1$ et une chaîne génétiquement différente $\alpha 2$), de protéoglycanes et de protéines non-collagèneuses. Cependant, la matrice osseuse (ou ostéoïde) utilise des cristaux d'hydroxyapatite ($3 [Ca_3PO_4)_2OH)_2]$) à l'intérieur et sur les fibres de collagène pour se calcifier. D'ailleurs, c'est la capacité élevée de liaison ionique des glycoprotéines et des protéoglycanes qui semble jouer un rôle important dans la fixation de cristaux d'hydroxyapatite aux fibres de collagène et dans le processus de calcification. De façon générale, les minéraux constituent 50-70% de la composition de l'os adulte de mammifères (Baron, 2003).

2.3.1 Structure macroscopique de l'os

De façon générale, il est possible de distinguer deux types d'os selon leur forme dans le squelette humain: les os longs (retrouvés dans les membres – tibia, fémur, etc.) et

les os plats (retrouvés dans le sternum, les côtes, le crâne, etc.) (Baron, 2003; Marieb, 1993). Ces deux types d'os dérivent de deux types de développement différents (endochondrale dans le cas des os longs et intramembranaire dans le cas des os plats). La structure d'un os long est schématisée à la figure 8. Elle comprend deux extrémités qui sont appelées épiphyses et un corps plus ou moins cylindrique, nommé diaphyse (Marieb, 1993). Les surfaces interne et externe des os longs sont constituées de membranes protectrices qui sont respectivement appelées endoste et périoste (Marieb, 1993). Ces membranes possèdent des cellules ostéogéniques (ostéoblastes et ostéoclastes) organisées en lacunes (Baron, 2003). Les os plats, quant à eux, sont plutôt minces, aplatis et, en général, légèrement courbés.

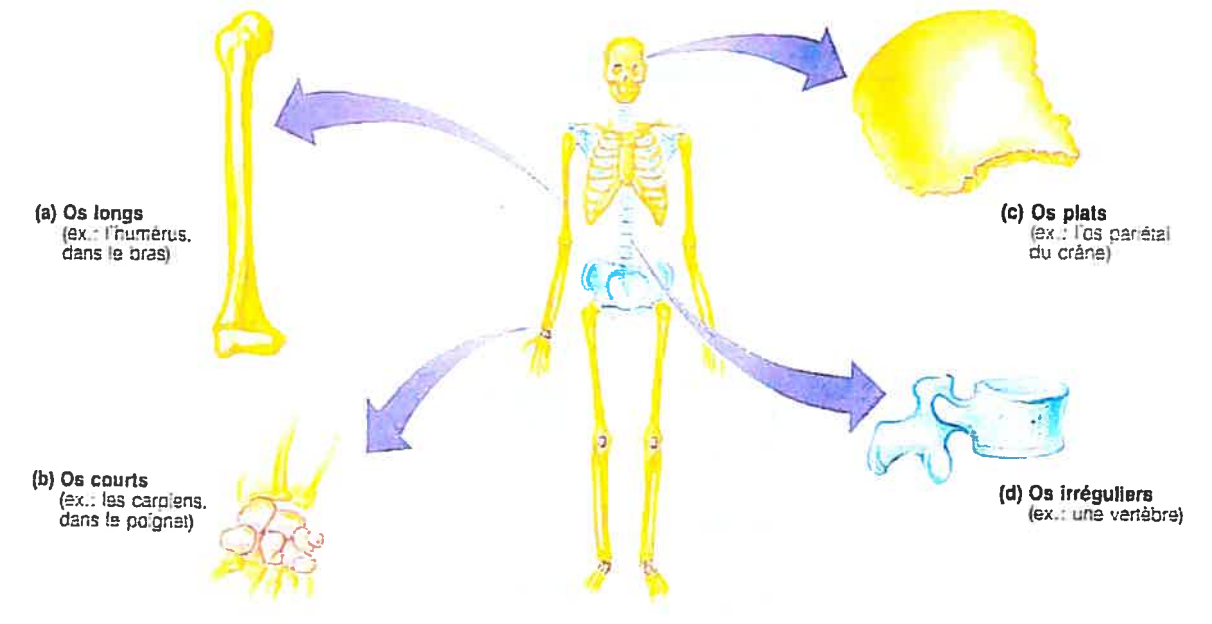


Figure 7 : Classification de l'os selon leur forme (Marieb, 1993)

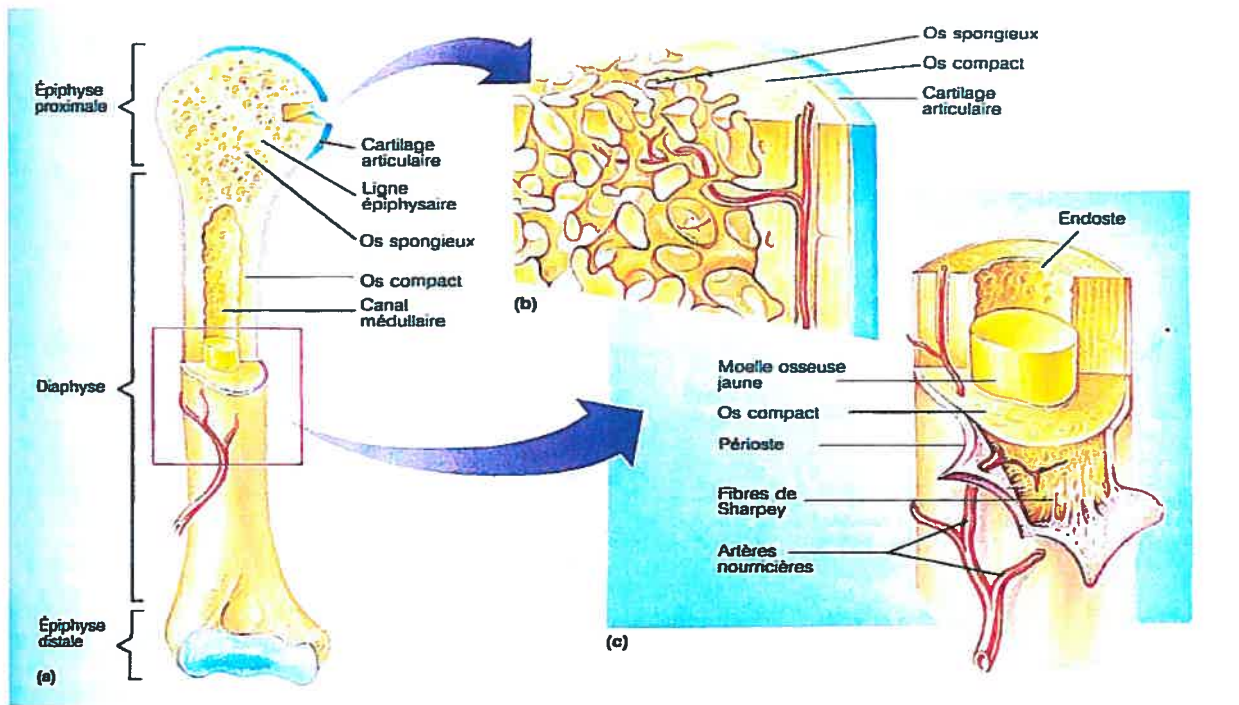


Figure 8 : Structure macroscopique et microscopique d'un os long (Marieb, 1993)

2.3.2 Structure microscopique de l'os

Tous les os (longs et plats) sont également composés de deux principaux types de tissu osseux qui sont représentés dans la figure 8 : l'os compact (ou cortical) et l'os spongieux (ou trabéculaire).

L'os compact ou cortical possède les caractéristiques d'un tissu osseux dense et solide. Comme présenté dans la figure 8, l'os compact représente le tissu osseux externe dont l'unité structurale est nommée ostéon ou système de Havers. Ce système Havers comprend un ensemble de cylindres creux placés les uns dans les autres et composés de la matrice ostéoïde (Marieb, 1993). Chacun de ces cylindres constitue une lamelle et c'est pour cette raison que l'os compact est souvent appelé os lamellaire (voir figure 9). Il existe aussi un canal au centre de l'ostéon qui est appelé canal central de l'ostéon ou canal de Havers, où des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses servent à nourrir les cellules de l'ostéon (Marieb, 1993). Il y a également des canaux de d'autres types orientés perpendiculairement à l'axe de l'ostéon qui sont appelés canaux perforant de l'os compact ou canaux de Volkmann (Marieb, 1993). Ces canaux permettent des connexions nerveuses et vasculaires entre le périoste, les canaux de Havers et le canal médullaire. Entre les lamelles de l'ostéon, on retrouve des cellules osseuses matures, les ostéocytes, dans des lacunes et des canalicules relient ces lacunes entre elles par des excroissances afin de permettre aux nutriments et aux déchets de passer facilement d'un ostéocyte à un autre (Marieb, 1993). Par conséquent, la fonction des ostéocytes est d'entretenir la matrice ostéoïde par le biais d'un relais entre ces cellules.

L'os spongieux ou trabéculaire, quant à lui, semble être un tissu osseux léger et peu structuré comprenant un réseau de travées où des lamelles irrégulières et des canalicules reliant des ostéocytes entre elles, sont présentes (Marieb, 1993). Il n'existe pas d'ostéon. Toutefois, les nutriments parviennent aux ostéocytes par diffusion à l'intérieur des canalicules. Ce tissu semble plutôt posséder un rôle de résistance mécanique face aux contraintes subies par l'os (Marieb, 1993).

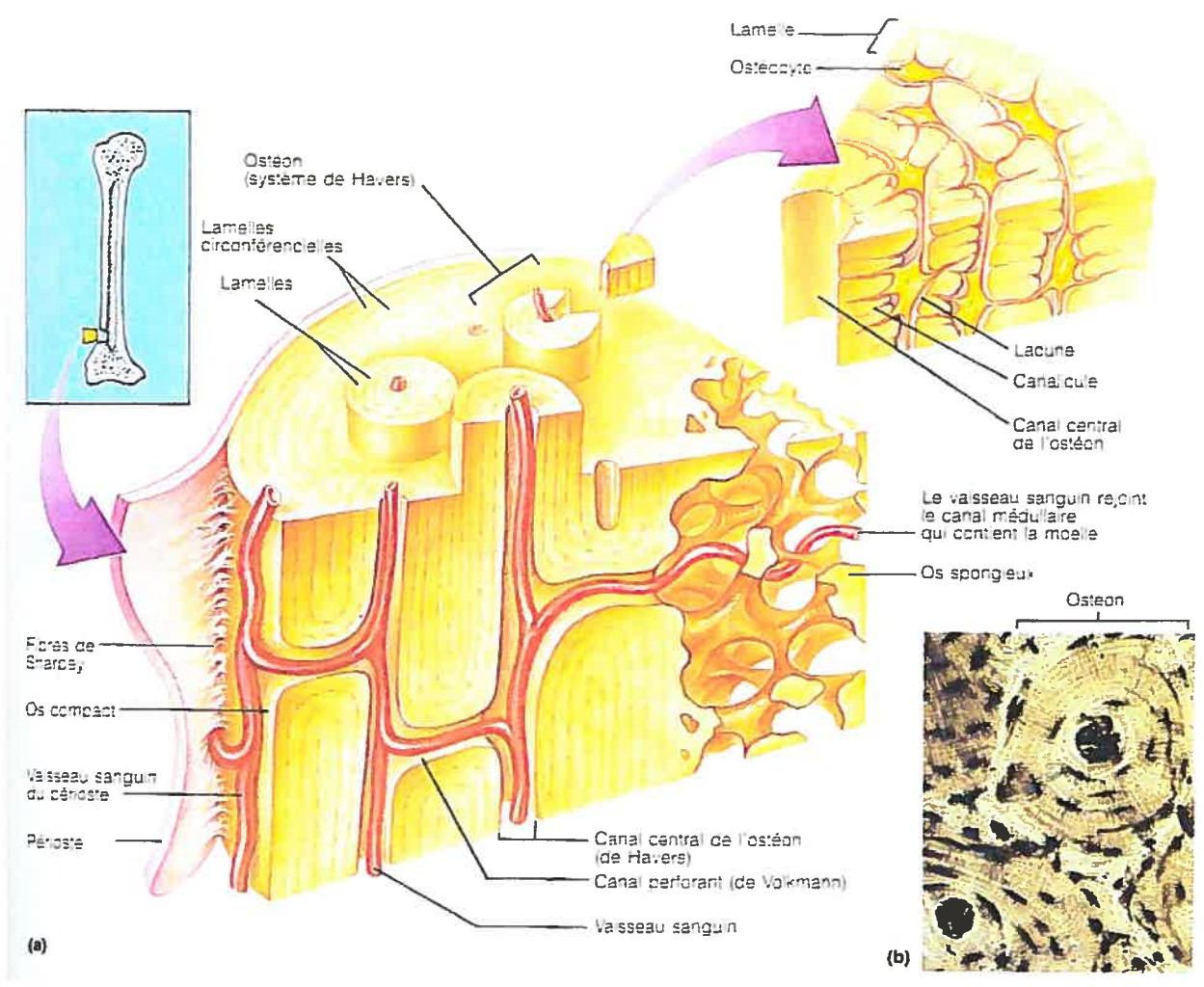


Figure 9 : Structure microscopique de l'os compact (Marieb, 1993)

2.3.3 Les cellules osseuses

Les ostéoclastes sont les premières cellules impliquées dans le remodelage osseux. Elles dérivent de la lignée cellulaire monocyttaire / macrophagique et elles constituent la lignée de cellules responsables de la résorption osseuse ou de la réabsorption des composants du tissu osseux (voir figure 10). La différenciation de pré-ostéoclaste en ostéoclaste requiert l'aide de facteurs de transcription PU-1 (aussi appelé Spi-1 : facteur de transcription faisant partie de la famille de protéines liées à l'ADN, ETS, qui possède la capacité d'activer les séquences de boîtes PU dans la lignée de cellules hématopoïétiques) et MITf («Microphthalmia-associated transcription factor» est un facteur de transcription, membre de la sous-famille «basic/helix-loop-helix/leucine zipper» ou b-HLH-ZIP, qui est nécessaire au développement appropriée de plusieurs lignées cellulaires, dont les ostéoclastes) lors du processus précoce, de M-CSF («macrophage-colony-stimulating factor»: cytokine spécifique de lignée cellulaire possédant un rôle de prolifération, de différenciation et de survie) et de RANKL («Receptor Activator for NFκB Ligand» : ligand appartenant au système paracrine de la voie de signalisation RANK) lors du processus intermédiaire, et de régulateurs négatifs de la voie de signalisation de RANK lors du processus final (Fisher et Scott, 1998; Hershey et Fisher, 2004; Barreda *et al.* 2004; Baron, 2003). Morphologiquement (voir figure 12), l'ostéoclaste est une cellule géante multinucléée (de 4 à 20 noyaux). Elle est habituellement retrouvée à la surface d'os calcifié et à l'intérieur de lacunes (lacunes de Howship's) qui ont été formées par leur activité résorptive. Généralement, elles ne sont pas plus d'une ou de deux cellules par lacune (Baron, 2003). Leurs caractéristiques cytoplasmiques incluent un appareil de Golgi abondant et complexe disposé autour du noyau, des mitochondries et des vésicules remplies d'enzymes lysosomales.

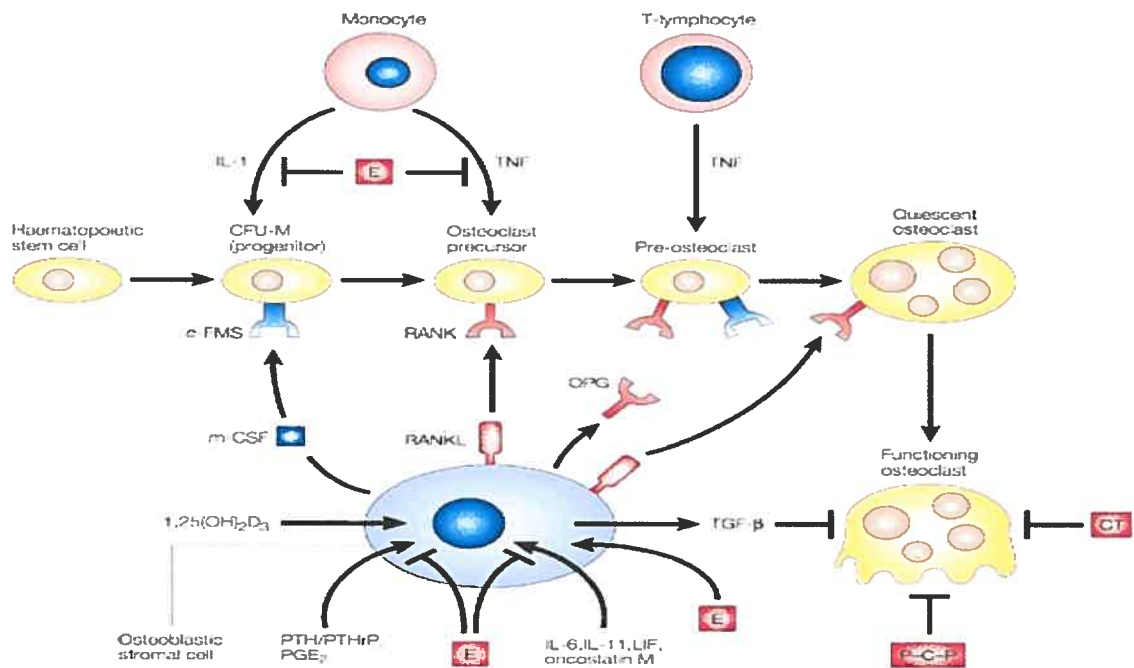
La liaison de l'ostéoclaste à la matrice ostéoïde s'effectue grâce à des récepteurs d'intégrines ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ et $\alpha 2 \beta 1$) qui lient des séquences spécifiques des protéines de la matrice ostéoïde (Baron, 2003). Une fois liés, un environnement «hermétique» se forme entre l'ostéoclaste et la matrice ostéoïde. La partie bordure en brosse de sa

membrane plasmique est très active et extrêmement polarisée, le pôle baso-latéral est hautement et spécifiquement enrichi de pompes Na^+/K^+ ATPase, d'échangeurs HCO_3^- et Na^+/H^+ , ainsi que de plusieurs canaux ioniques. Cette membrane exprime également les récepteurs RANK, M-CSF et calcitonine (Baron, 2003).

Le mécanisme de résorption osseuse implique l'augmentation de la concentration extracellulaire d'enzymes lysosomales par la sécrétion massive de ces enzymes à travers la bordure en brosse vers le compartiment extracellulaire «hermétique», la sécrétion de plusieurs métalloprotéases (comme la collagénase et la gélatinase) et l'acidification du compartiment extracellulaire par la sécrétion de protons à travers la membrane de bordure en brosse. Toutes ces dernières actions engendrent la déminéralisation de la matrice ostéoïde (dissolution des cristaux d'hydroxyapatite) et la dégradation protéolytique de la matrice ostéoïde.

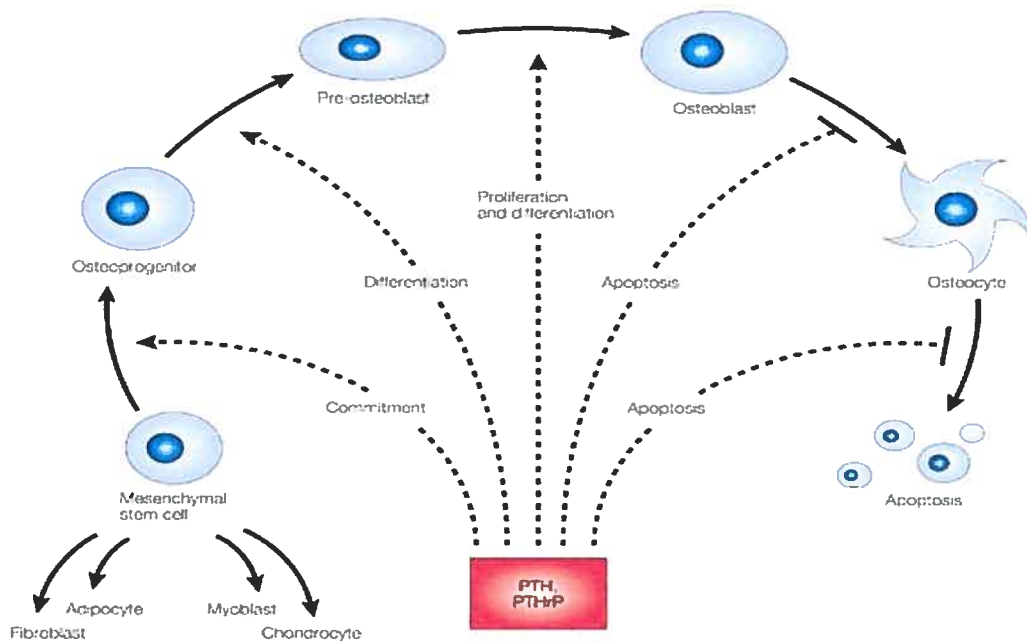
Les ostéoblastes (Obs) constituent les cellules responsables de la synthèse et de l'élaboration de la matrice ostéoïde. Morphologiquement (voir figure 12), les Obs sont des cellules de forme cuboïde qui sont toujours regroupées en amas de 100 à 400 cellules par site de formation. Elles présentent un noyau rond situé à la base cellulaire, un cytoplasme hautement basophile, un appareil de Golgi complexe comprenant de multiples réserves et situé entre le noyau et le côté apical de la cellule, et un réticulum endoplasmique extrêmement développé avec des citernes dilatées et un contenu granulaire dense (Baron, 2003). Sa membrane plasmique est enrichie de phosphatase alcaline (ou ALPase : enzyme tétramérique liée à la membrane jouant un rôle dans la minéralisation de la matrice ostéoïde) dont sa concentration dans le sérum est utilisée comme outil déterminant de formation osseuse. La présence de récepteurs pour l'hormone parathyroïdienne (PTH), pour les prostaglandines (PGs), pour des hormones stéroïdiennes comme les oestrogènes, pour la vitamine D_3 , pour des molécules d'adhésion comme les intégrines et pour des cytokines a été révélée sur ces cellules (Baron, 2003).

Les ostéoblastes synthétisent et minéralisent la matrice ostéoïde au cours de la croissance du squelette, la renouvellent chez l'adulte et la réparent tout au long de la vie (Marie, 2001). Au niveau des os longs (développement endochondral), la différenciation des Obs est réalisée à partir de cellules souches mésenchymateuses médullaires sous l'induction de plusieurs facteurs (FGF - «Fibroblast Growth Factor»: facteur de croissance et régulateur important de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose des ostéoblastes -, BMP - «Bone Morphogenetic proteins»: membres de la famille du TGF- β , elles sont produites par les ostéoblastes et jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la formation osseuse -, etc.) et de facteurs de transcription (CbFa1/Runx2 – membre de la famille de facteurs de transcription caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN homologue de type Runt/CbFa, il est essentiel à l'engagement et à la différenciation des ostéoblastes - et Osterix – facteur de transcription essentiel à l'induction de la différenciation des ostéoblastes -). Au niveau des os plats (développement intramembranaire), la différenciation des Obs s'effectue à partir de cellules précurseurs mésenchymateuses dérivées de la crête neurale par un processus de condensation du mésenchyme (Marie, 2001). Initialement, l'ostéogenèse est caractérisée par l'activation et la prolifération de cellules ostéoprogénitrices qui se différencient en pré-Obs, puis en Obs mûrs (voir figure 11). Les marqueurs précoces de la différenciation ostéoblastique sont: les facteurs de transcription Cbfa1/Runx2, les gènes *c-fos* et histone *H4*. Lors de la phase de maturation, il y a expression de gènes ostéoblastiques et associés à la production de la matrice, soit l'ALPase, le collagène de type I, l'ostéopontine, le TGF- β et la fibronectine. Finalement, les Obs différenciés expriment des marqueurs tardifs de différenciation, soit l'ostéocalcine (ou OC : protéine non-collagèneuse majeure de la matrice extracellulaire sécrétée par les Obs, qui contribue à la régulation de la formation osseuse) et la sialoprotéine osseuse, au début de la minéralisation de la matrice (Marie, 2001).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 10: Origine, différenciation des ostéoclastes et ses régulateurs (Goltzman, 2002)



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 11: Origine et différenciation des ostéoblastes (Goltzman, 2002)

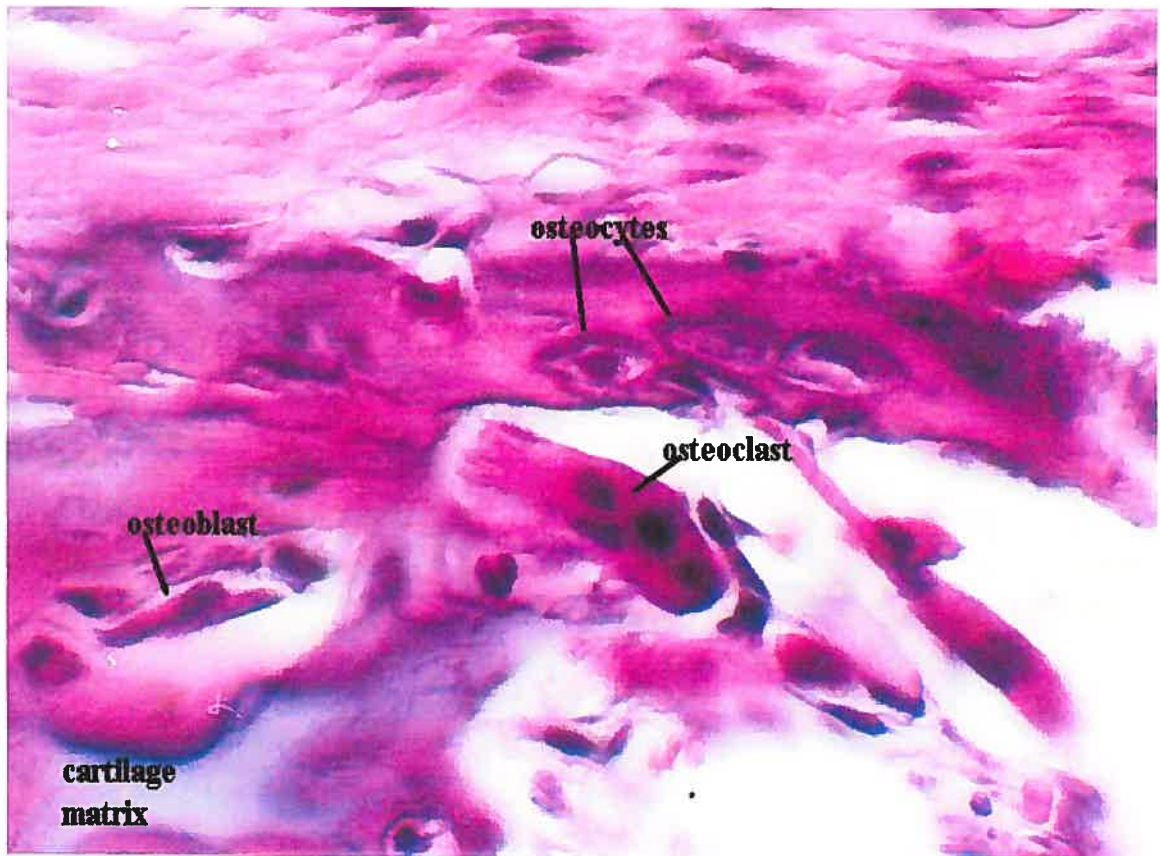


Figure 12 : Morphologie des cellules osseuses

Tiré du site : http://cellbio.utmb.edu/microanatomy/bone/synochondral_bone_development.htm

2.3.4 Le remodelage osseux

Le tissu osseux est en perpétuel renouvellement par un processus de remodelage osseux effectué par les deux types cellulaires décrits précédemment (les ostéoclastes et les Obs). Cette activité d'une durée approximative de 3 à 4 mois est réalisée sur la surface osseuse, plus spécifiquement la surface endostale et elle permet de maintenir la masse osseuse au cours de la vie adulte normale (Baron, 2003; Marie, 2001). Ce cycle est schématisé dans la figure 13 et sa séquence d'événements est appelée activation-résorption-formation (ou séquence ARF) (Marie, 2001; Burr, 2004). Elle débute donc par une phase d'activation (différenciation des ostéoclastes schématisée dans la figure 10) et se poursuit par une phase de résorption de la matrice (d'une durée d'environ 10 jours) par des ostéoclastes matures. Il existe ensuite une phase de conversion entre la phase de résorption et la phase de formation qui dure environ 5 jours chez les humains (Burr, 2004). L'étape suivante constitue l'étape la plus longue (durée approximative de 3 mois), elle est caractérisée par la réparation de la lacune de résorption selon le scénario suivant : le détachement et la mort par apoptose des ostéoclastes, la migration des cellules précurseurs des Obs et leur différenciation en Obs matures (schématisée dans la figure 11) puis la synthèse et la minéralisation de la nouvelle matrice ostéoïde. Lorsque le cycle se termine, les Obs s'aplatissent et bordent la surface osseuse. Une partie de ces cellules meurent par apoptose et le reste s'inclut dans la matrice qu'ils viennent de synthétiser et deviennent des ostéocytes reliés par des excroissances (Marie, 2001). Les ostéocytes représentent le stade de différenciation terminale des Obs supportant la structure osseuse et les fonctions métaboliques (Lian *et al.* 2003).

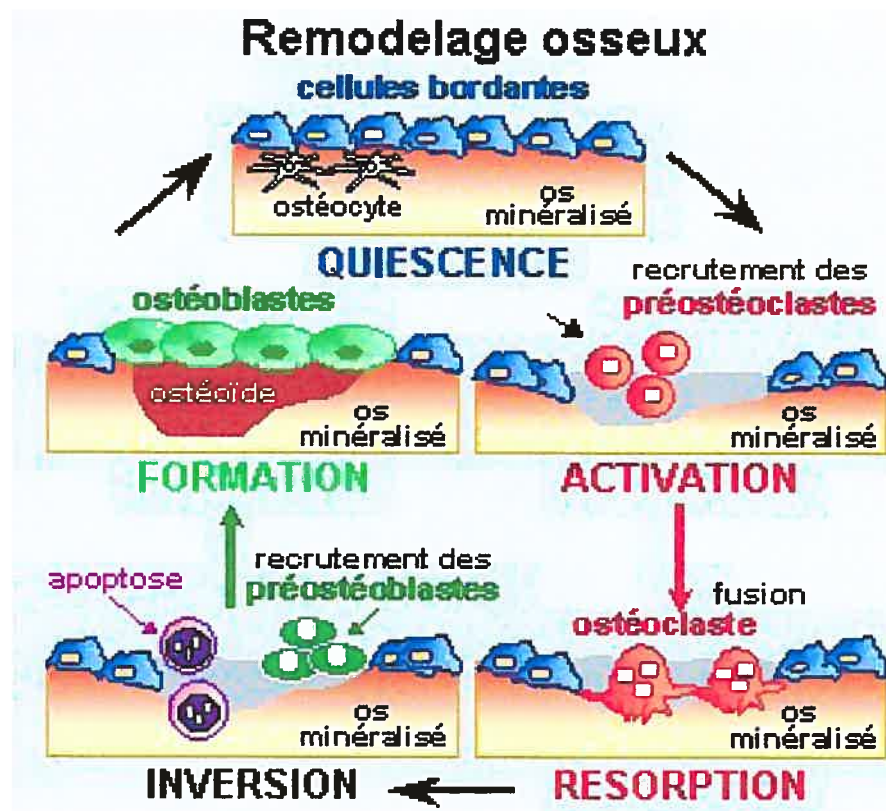


Figure 13 : Cycle du remodelage osseux

Tiré du site : www.unsa-jouy.inra.fr/nutos/remodos.htm

2.3.4.1 La régulation du remodelage osseux

Le déséquilibre du processus de remodelage osseux ou du couplage entre la résorption osseuse et la formation osseuse a des répercussions importantes sur l'architecture et la masse osseuse. Ceci pourrait conduire, à long terme, à une perte d'intégrité structurale du squelette ou à des fractures et engendrer la morbidité ou la mortalité lors du vieillissement (Marie, 2001). Il est donc primordial que ce processus soit bien régulé. Plusieurs facteurs et hormones ont un rôle à jouer dans cette régulation (voir figure 10). Dans cette section, un aperçu des facteurs ou hormones les plus pertinents pour l'étude (qui sera décrite un peu plus loin) sera donné.

2.3.4.2 Les facteurs systémiques

L'hormone parathyroïdienne (PTH), la 1,25-dihydroxy-vitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃) et la calcitonine (Ct) sont les principales hormones qui agissent au niveau systémique et qui régulent le remodelage osseux. D'ailleurs, la PTH et la 1,25(OH)₂D₃ utilisent le même mécanisme de régulation.

Les vitamines D sont des substances liposolubles dérivées des stérols (Idelman et Verdetli, 2000). Dans l'os, la forme active de la vitamine D₃ (aussi connue sous le nom de 1,25-dihydroxy-vitamine D₃, 1,25-dihydroxy-vitamine D₃) est classifiée comme une hormone résorptive (Farach-Carson et Ridall, 1998). Sa fonction principale est le maintien de l'homéostasie du calcium dans le sérum à des niveaux physiologiques. Pour ce faire, il doit, entre autres, recruter des cellules précurseurs dans l'os afin qu'elles se différencient en ostéoclastes matures et que ces derniers mobilisent et libèrent dans la circulation le calcium qui avait été stocké en réserve dans l'os (Holick, 2003). Le processus de différenciation se réalise par une interaction avec le récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR) des Os et l'induction d'une transduction d'un signal permettant la production de RANKL à leur surface. Comme les pré-ostéoclastes possèdent le récepteur RANK pour le ligand RANKL, le contact direct de RANK du pré-ostéoclaste avec RANKL de l'Ob va engendrer la transduction de signal nécessaire à la

différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures (Holick, 2003). Ce dernier processus est schématisé dans la figure 10. La vitamine D₃ possède également des effets physiologiques importants sur la différenciation ostéoblastique en stimulant l'expression de gènes ostéoblastiques tels que l'ostéocalcine et l'ostéopontine (Marie, 2001). Plusieurs études ont démontré qu'en réponse au traitement de la 1,25(OH)₂D₃, les Obs observés commencent à déposer la matrice extracellulaire (spécifique à l'os) qui va être calcifiée par la suite (Farach-Carson et Ridall, 1998). Par conséquent, la vitamine D₃ est un stimulateur de la résorption osseuse par les ostéoclastes et de la synthèse de protéines matricielles osseuses par les Obs. Elle favoriserait également, par le fait même, la minéralisation osseuse.

La PTH est un polypeptide de 84 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 8500 Daltons (Da), sécrété par les glandes parathyroïdiennes (Idelman et Verdetli, 2000). Au niveau de l'os, sa principale fonction est de mobiliser le calcium osseux. La PTH libère aussi du tissu osseux des phosphates, de l'hydroxyproline, du citrate et du magnésium (Idelman et Verdetli, 2000). Ainsi, elle favorise l'ostéolyse en stimulant la formation et l'activité des ostéoclastes. Cependant, l'effet de la PTH sur la formation des ostéoclastes semble être indirect. La PTH stimule l'expression et la production de RANKL à la surface des Obs qui stimule les ostéoclastes (Mundy *et al.* 2003). La PTH possède aussi une activité stimulatrice de la formation osseuse si elle est administrée de façon intermittente. En effet, l'administration intermittente de la PTH *in vivo* stimule la formation de l'os trabéculaire (Marie, 2001). Elle stimule également la prolifération des précurseurs ostéoblastiques en induisant l'expression de *c-fos* et en prolongeant la vie de l'ostéoblaste par une action inhibitrice de l'apoptose (Marie, 2001). Par conséquent, la PTH peut stimuler la résorption ostéoclastique et la formation osseuse dépendamment de son administration continue ou intermittente.

Contrairement à la PTH, la calcitonine (Ct) est une hormone hypocalcémisante. Elle est élaborée par les cellules parafolliculaires et sécrétée par la thyroïde. Il s'agit d'une hormone polypeptidique de 3400 Da. Ses principales fonctions sont l'épargne calcique et la stimulation de la formation osseuse *de novo* (Idelman et Verdetli, 2000). Ces

dernières fonctions se produisent par un puissant mécanisme d'inhibition de la résorption ostéoclastique. Aussi, ses effets sont transitoires (Mundy *et al.* 2003).

2.3.4.3 Les facteurs locaux

Les hormones locales et les cytokines peuvent être considérées comme étant plus importantes que les hormones systémiques (vu précédemment) pour l'initiation de la résorption physiologique osseuse et la séquence normale de remodelage osseux (Mundy *et al.* 2003). Parmi les facteurs locaux les plus importants dans la régulation du remodelage osseux, on retrouve des facteurs produits par les Obs qui sont séquestrés dans la matrice ostéoïde, tels que *l'insulin growth factor* (IGF-1), le *transforming growth factor β* (TGF- β), les *bone morphogenetic proteins* (BMPs) et les *fibroblast growth factors* (FGFs) (Marie, 2001).

Le facteur local TGF- β est un polypeptide multifonctionnel de 112 acides aminés et de masse moléculaire de 25 kDa qui est produit par des cellules immunitaires ou sous forme latente par des Obs. Il est stocké dans la matrice ostéoïde en association avec une protéine porteuse (LTBP) et est sécrété par les cellules stromales et les Obs. Il en existe plus de 30 molécules distinctes chez une variété d'espèces et trois isoformes chez les mammifères (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3). Elles possèdent des activités biologiques similaires et sont toutes trois synthétisées par les cellules osseuses (Marie, 2001; Canalis, 2003). TGF- β possède un effet complexe sur les ostéoclastes : chez le rat et chez l'humain, il a été observé que le TGF- β exogène bloque la formation des ostéoclastes en inhibant la prolifération et la différenciation des précurseurs des ostéoclastes. Toutefois, dans des systèmes humains, il a été constaté que le TGF- β endogène stimule l'ostéoclastogénèse (Mundy *et al.* 2003). Ainsi, on pourrait supposer que cette complexité pourrait impliquer un effet différentiel dans des cas de surproduction hormonale. En ce qui a trait aux Obs, TGF- β possède un effet puissant de stimulation de la prolifération ostéoblastique, de la synthèse de protéines différenciées et de la formation d'os minéralisé (Mundy *et al.* 2003). D'ailleurs, il a été observé *in vitro* que

TGF- β stimule aussi la prolifération des pré-Obs, la production du collagène de type I et de l'ostéopontine (Marie, 2001). En conséquence dans des conditions physiologiques, grâce à toutes ces fonctions, la molécule de TGF- β pourrait constituer un facteur clé lors du remodelage osseux en agissant comme un composant central du couplage entre la formation osseuse et la résorption osseuse (Mundy *et al.* 2003).

D'autres facteurs locaux ou cytokines jouant un rôle dans la régulation du remodelage osseux s'avèrent utiles à décrire à cause de leur implication dans l'étude qui sera décrite un peu plus loin. L'interleukine-18 (IL-18 ou *INF- γ -inducing factor*) est une cytokine pro-inflammatoire glycoprotéique (de 18 kDa) homologue et membre de la famille de cytokine IL-1 qui est produite par les macrophages activés, les cellules stromales de la moelle et les Obs. L'IL-18 est régulé de façon fonctionnelle par l'«IL-18 binding protein» (ou IL-18BP). Dans des co-cultures de cellules hépatiques murines et d'Obs, une action inhibitrice de formation des ostéoclastes par IL-18 (réalisée via le *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor* ou GM-CSF) a été démontrée. Cette dernière action a été validée et confirmée par l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre GM-CSF qui a permis d'empêcher l'action inhibitrice de formation des ostéoclastes par IL-18 (Udagawa *et al.* 1997; Mundy *et al.* 2003).

Les prostaglandines (PGs) et les leucotriènes (LTs) possèdent des effets multiples et complexes sur les ostéoclastes. Ils constituent tous deux des métabolites de l'acide arachidonique qui sont associés à la résorption osseuse par les ostéoclastes (Mundy *et al.* 2003). Plus spécifiquement, la prostaglandine E₂ (PGE₂) interagit directement avec les Obs pour activer les ostéoclastes. Son mécanisme sera discuté plus en détail dans la section 3.1.2. Les PGE₂ représentent donc des facteurs majeurs de contrôle dans le métabolisme osseux : les Obs produisent du PGE₂, ce dernier peut ensuite modifier la fonction des Obs par un mécanisme de rétroaction positive. De plus, des concentrations faibles de PGE₂ stimulent la formation osseuse alors que des concentrations élevées de PGE₂ stimulent la résorption osseuse médiée par les Obs (Watrous et Andrew, 1989). C'est probablement par ces actions opposées que cette rétroaction positive réalisée par

les Obs a lieu. Tout comme pour le PGE₂, les LTs stimulent fortement la résorption osseuse des ostéoclastes par un mécanisme de contrôle médié par les Obs, grâce à la production d'une protéine appelée «leukotriene-dependant polypeptide» qui sert à stimuler cette résorption (Watrous et Andrew, 1989). Ces deux composés eicosanoïdes (PGs et LTs) seront discutés plus en détails dans la section 3.

2.4 L'os sous-chondral arthrosique

En 1970, Radin et Paul ont été les premiers chercheurs à proposer que l'épaississement de l'os sous-chondral, survenant après la guérison de microfractures, serait possiblement l'événement pathogénique primaire de l'OA suite à leur étude de la capacité d'absorption de choc de l'os sous-chondral réalisée sur des condyles médiaux fémoraux de 43 patients (Radin *et al.* 1970). Bien que ce concept ait été négligé pendant longtemps, d'autres études, effectuées autant avec des modèles animaux qu'avec des modèles humains, ont supporté cette découverte par la suite (Grynpas *et al.* 1991). Depuis 1999, il est possible de suggérer, en tenant compte du fait que le cartilage est une structure aneurale, et des preuves expérimentales obtenues antérieurement, que l'os sous-chondral représente l'élément structural le plus important dans l'apparition de la douleur (par l'implication de la pression intra-osseuse et de la croissance d'ostéophytes) et dans la progression de la maladie (Dieppe, P. 1999).

2.4.1 Les caractéristiques générales de l'os sous-chondral arthrosique

En plus de l'épaississement cortical de l'os sous-chondral dû à une augmentation de l'ostéogénèse et à une augmentation du remodelage osseux, il est possible d'observer les changements suivants chez les patients atteints d'OA : une érosion de la surface articulaire (cartilage) avec l'apparition d'ostéophytes (dans certains cas) et une hypominéralisation (Grynpas *et al.* 1991). Les ostéophytes sont des épérons irréguliers ou des excroissances irrégulières osseuses aussi appelés des nodules d'Heberden (Vaillancourt, G. 1990). Par ailleurs, Mansell et Bailey corroborent cette hypominéralisation ainsi que l'augmentation accrue d'une ostéoformation (Mansell et

Bailey, 1998). En définitive, un fait particulièrement intéressant ressort de l'étude effectuée par Gryn timerpas *et al.* (1991). Cette étude a significativement démontré que les modifications décrites précédemment sont distinctes et indépendantes des modifications normales associées au vieillissement. Autrement dit, ces modifications sont considérées comme des caractéristiques propres à la pathologie (Gryn timerpas *et al.* 1991).

2.4.2 Les ostéoblastes sous-chondraux arthrosiques

Les cultures cellulaires humaines d'Obs représentent l'un des outils permettant de déterminer les causes mécanistiques de pathologies de formation osseuse, comme l'OA. D'ailleurs, les études récentes sur le développement qui comparaient le comportement des Obs humains *in vitro* et la formation osseuse ont indiqué que les cultures d'Obs pourraient constituer une approche intéressante pour l'étude des altérations génétiques ou acquises de la formation osseuse (Marie, 1994). C'est donc cet outil que nous avons exploité comme modèle d'étude pour fins d'analyse des mécanismes impliqués dans la pathologie d'OA. Ainsi, il aurait paru intéressant d'utiliser les cellules d'Obs OA de l'os sous-chondral comme modèle d'étude pour analyser le phénotype de ces cellules et le comparer au phénotype des cellules normales. Après avoir exploité cet outil, notre laboratoire a pu découvrir que ces cellules présentent un métabolisme et un phénotype altérés en comparaison avec des cellules normales (Hilal *et al.* 1998; Hilal *et al.* 1999; Massicotte *et al.* 2002; Lajeunesse, 2004). La liste des marqueurs biochimiques modifiés dans les cellules OA est présentée dans le tableau II et la figure 14. Il a été démontré que les Obs de l'os sous-chondral OA produisent moins d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) en réponse à la PTH et au PGE₂ que les Ob normaux (Hilal *et al.* 1998). Une altération de la production de ALPase et d'ostéocalcine a aussi été révélé en présence de 1,25(OH)₂D₃ (Hilal *et al.* 1998). Notre laboratoire avait aussi suggéré que deux systèmes majeurs impliqués dans la régulation de la densité osseuse, le système activateur du uPA/Plasmin (urokinase plasminogen activator/Plasmin) et de l'«insulin-like growth factor» (IGF-1), pouvaient être dérégulés dans ces cellules. Effectivement, cette hypothèse a été validée *in vitro* et *in vivo*, car tous

les Obs sous-chondraux OA ont produit des niveaux élevés d'IGF-1 et d'uPA (Hilal *et al.* 1998; Lajeunesse *et al.* 1999).

Plus récemment, notre laboratoire a révélé que les Obs sous-chondraux OA produisent des niveaux beaucoup plus élevés de TGF- β que les Ob normaux correspondants (Massicotte *et al.* 2002). Ces niveaux particulièrement augmentés ont également été observés dans le compartiment proximal humain de têtes fémorales OA dans une étude *in vivo* réalisée par Mansell et Bailey (1998). Plus spécifiquement, leurs études ont démontré un niveau quatre fois plus élevé de TGF- β que les cas contrôles, ces dernières observations corrélaient bien avec le niveau d'épaississement de l'os sous-chondral (Mansell et Bailey, 1998; Bailey et Knott, 1999). Le TGF- β est un inhibiteur de la formation et de l'activité des ostéoclastes et possède un effet puissant de stimulation de la prolifération ostéoblastique. De plus, les Obs sont responsables de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Ainsi, par cette prolifération élevée d'Obs, le TGF- β engendrerait une forte augmentation de l'ostéogenèse et une augmentation de la densité osseuse perçue chez les patients atteints. On a également fait la distinction entre deux groupes de patients OA (des producteurs faibles ou forts) selon leur production de PGE₂ et d'IL-6 (Massicotte *et al.* 2002). En conséquence, tous les marqueurs, facteurs et cytokines décrits précédemment qui sont modifiés témoignent d'un comportement phénotypique altéré dans les Obs OA.

Tableau II : Variation des marqueurs métaboliques des ostéoblastes sous-chondraux OA

Marqueur métabolique modifié dans les ostéoblastes OA	Marqueur métabolique analysé dans les ostéoblastes normaux et OA
AMPc ↘	AMPc
uPA ↗	uPA
Plasmine ↗	Plasmine
IGF-1 ↗	IGF-1
Collagène de type I ↗	Collagène de type I
Phosphatase Alcaline ↗	Phosphatase Alcaline
Ostéocalcine ↗	Ostéocalcine

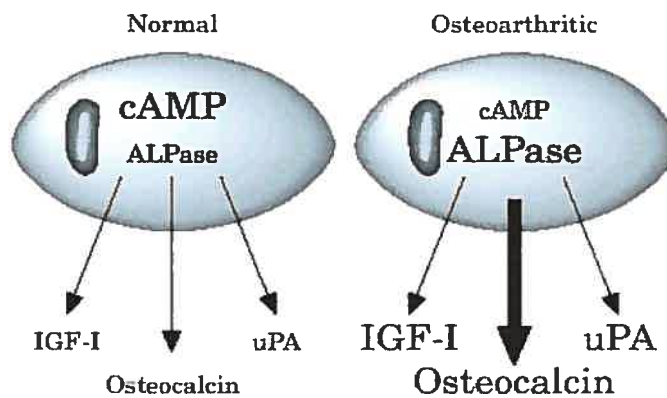


Figure 14 : Phénotype modifié des ostéoblastes OA (Lajeunesse *et al.* 1999)

2.5 Interactions entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire

Malheureusement, il existe toujours un débat à savoir si les modifications de l'os sous-chondral apparaissent avant, après ou en même temps que les changements dégénératifs du cartilage articulaire (Westacott *et al.* 1997; Burr, 1998; Lajeunesse, 2003). D'un point de vue thérapeutique, il s'avèrerait essentiel de faire cette découverte afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie (Lajeunesse, 2004).

Dans les études antérieures effectuées pour tenter de répondre à cette question, il y a eu plusieurs démonstrations du modèle qui révèle que les changements de l'os sous-chondral précèdent ceux du cartilage (Burr, 1998). Cependant, elles sont non concluantes à ce stade. Parmi les exemples de ces études, il y avait le système de co-culture des milieux de cultures de cellules dérivées de l'os OA et non-OA (NA) avec des explants de cartilage qui a permis d'observer une libération de glycosaminoglycanes (un composant essentiel de la matrice cartilagineuse) du cartilage en réponse au milieu conditionné des cellules Obs OA (Westacott *et al.* 1997). Chez un modèle de primate avec une ostéoarthrose spontanée, une corrélation a été observée entre l'épaississement de la plaque sous-chondrale et la sévérité d'ostéoarthrose du cartilage du plateau tibial médial (Burr, 1998). Cette étude a permis de suggérer que l'os pourrait être un facteur de progression de la maladie. Par ailleurs, une augmentation de la captation de diphosphonate lié au technetium (indicateur de l'élévation de l'activité de l'os sous-chondral), prédirait la perte de cartilage chez des patients atteints d'OA, et les lésions du cartilage ne progressaient pas en l'absence d'activité sous-chondrale significative (Dieppe *et al.* 1993). Finalement, d'autres études avec le modèle de primate *Macaca fascicularis* et le cochon d'inde *Dunkin-Hartley* ont fortement corroboré ce concept (Carlson *et al.* 1994 ; Carlson *et al.* 1996; Billingham *et al.* 1996). Néanmoins, une étude d'injection d'acide mono-iodoacétique dans l'articulation du genou de rats a indiqué, par échographie ultrasonique, que les changements de propriétés de l'os et du cartilage se produisent de façon concomitante (Burr, 1998).

Ainsi, grâce à ces découvertes scientifiques, il est possible d'affirmer que la sclérose sous-chondrale accompagne (d'une manière ou d'une autre) la dégénérescence du cartilage et que ce lien semble être associé plus particulièrement à la progression de la pathologie (Burr, 1998; Matsui *et al.* 1997; Lajeunesse et Reboul, 2003). D'ailleurs, plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que des facteurs de croissance ou des cytokines ou des enzymes (produits par l'os sous-chondral et jouant un rôle clé dans les changements osseux de l'OA) pourraient être à l'origine de la stimulation de cette dégénérescence du cartilage (Burr, 1998 ; Westacott *et al.* 1997; Martel-Pelletier et Pelletier, 2003 ; Lajeunesse et Reboul, 2003).

Néanmoins, beaucoup plus d'études et des études plus poussées seraient requises afin de clairement établir la chronologie des événements et/ou la composante morphologique responsable de l'initiation de la pathologie de l'OA. En attendant, il serait primordial de comprendre les mécanismes de la réponse inflammatoire de l'OA afin de créer ou d'améliorer les agents thérapeutiques et, par le fait même, d'améliorer la qualité de vie des personnes atteintes. La prochaine section discutera de l'inflammation, de ses principaux médiateurs et des traitements thérapeutiques actuels.

3. LES EICOSANOÏDES

Les eicosanoïdes possèdent diverses fonctions dans pratiquement tous les organes, tissus et cellules de l'organisme. Tous les gènes codant pour un enzyme ou un récepteur des voies de signalisation des prostaglandines et des leucotriènes ont été identifiés, soit par ciblage de gène ou par la méthode de souris « knock-out » (Funk, 2001). Un des domaines du rôle des eicosanoïdes particulièrement étudié est l'inflammation. L'inflammation est la réponse physiologique qui protège les tissus affectés par des agents pathogènes ou par des traumatismes physiques. Elle est initiée par des actions très coordonnées de cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes/macrophages, lymphocytes, etc.) après l'atteinte cellulaire initiale. Le transport de ces cellules au site inflammatoire est régulé par une quantité phénoménale de récepteurs de surface et de ligands, avec la libération de chémokines, cytokines, amines vasoactives et médiateurs lipidiques bioactives (dont fait partie la catégorie d'eicosanoïdes) (Yopp *et al.* 2003). Les médiateurs lipidiques jouent un rôle clé dans les actions de ces cellules pro-inflammatoires.

Les eicosanoïdes sont des composés de 20 atomes de carbone dont le premier précurseur est l'acide arachidonique (ou AA). À partir de l'acide arachidonique, plusieurs voies métaboliques utiliseront l'AA comme substrat, telles que la voie de synthèse des prostaglandines (ou PGs), des leucotriènes (ou LTs), des lipoxines (LXs), etc. Cependant, seules les deux voies métaboliques majeures (celles des PGs et des LTs) seront discutées dans cette section.

3.1 Les prostaglandines (ou PGs)

Les PGs sont un groupe de composés de 20 atomes de carbone comprenant un acide carboxylique et un noyau cyclopentane (Mardini et Fitzgerald, 2001). Ils sont synthétisés *de novo* par la plupart des cellules et agissent comme des hormones locales (soit de façon paracrine ou autocrine). Plus spécifiquement, ils sont formés à partir de leur précurseur, l'AA, qui est sous forme de réserve dans les phospholipides

membranaires. Cet AA est donc clivé par l'enzyme phospholipase A₂ (ou PLA₂) lorsque les cellules sont activées par divers stimulus physiques ou chimiques : des traumatismes physiques (comme dans le cas d'une atteinte articulaire), des hormones, des cytokines, des facteurs de croissance, des immunoglobulines, la phagocytose, des lectines, etc. pour former les prostanoïdes (Funk, 2001). Dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et nucléaire, cet AA sera ensuite présentée à l'enzyme PG G/H synthase (PGHS). L'enzyme PGHS est une enzyme bifonctionnelle limitante qui possède une activité cyclooxygénase qui convertit l'AA en PGG₂ et une activité peroxydase qui réduit PGG₂ en PGH₂ (Mardini et Fitzgerald, 2001). La figure 15 schématise les étapes de la biosynthèse des PGs.

Comme la figure 15 le démontre, les prostanoïdes (PGs, prostacycline et thromboxane A₂) sont présents dans la plupart des organes ou tissus et sont synthétisés dans la plupart des cellules. Ils agissent comme seconds messagers intracellulaires selon deux mécanismes d'action : l'augmentation du calcium intracellulaire par l'intermédiaire de récepteurs «contractiles» (médié par une protéine G_q) et l'augmentation de l'AMP cyclique par l'intermédiaire de récepteurs «relaxants» (médié par une protéine G_s) (Funk, 2001). Le tableau III présente les activités de quelques prostanoïdes dans certaines cellules ou organes. On peut ainsi constater que les prostanoïdes jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie.

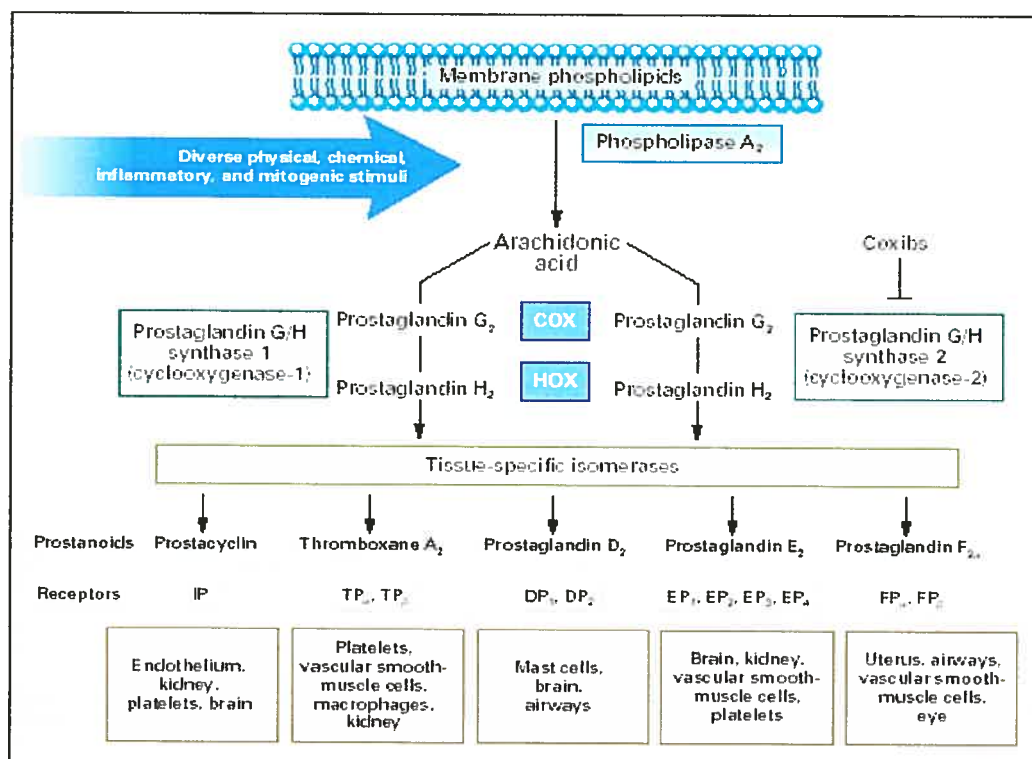


Figure 15 : Biosynthèse des prostanoides et tissus impliqués (Fitzgerald et Patrono, 2001)

Tableau III : Action(s) physiologique(s) et/ou pathologique(s) spécifique(s) des prostanoides

Organe ou cellule	Le ou les prostanoides impliqués	Action physiologique et/ou pathologique
Cellule musculaire lisse	TXA ₂ et PGI ₂	TXA ₂ : vasoconstriction PGI ₂ : vasodilatation
Plaquette	TXA ₂ et PGI ₂	TXA ₂ : agrégation PGI ₂ : inhibition de l'agrégation
Utérus	PGF _{2α}	Contraction
Lymphocyte	PGD ₂	Chémotactisme
Épithélium pulmonaire	PGD ₂	Asthme
Ostéoclaste	PGE ₂	Résorption osseuse
Neurones	PGE ₂	Fièvre
Ovaires	PGE ₂	Ovulation
Neurones de la moëlle	PGE ₂	Hyperalgésie
Circulation sanguine	PG?	Maintien de la pression artérielle ↓ PG? : hypertension artérielle
Rein	PGI ₂ , PDG ₂ et PGE ₂	Équilibre de la dynamique du sodium et de l'eau dans le sang rénal ↓ PGI ₂ et PGE ₂ : insuffisance rénale
Intestin	PGE ₂	Motilité intestinale
Muqueuse gastrique	PGI ₂ et PGE ₂	PGI ₂ : gastroprotection par vasodilatation ↓ PGE ₂ : ulcères gastriques

3.1.1 Pharmacologie des enzymes de biosynthèse des PGs

L'activité cyclooxygénase (COX) de l'enzyme PGHS existe sous deux isoformes : PGHS-1 (ou COX-1) ou PGHS-2 (ou COX-2) (Funk, 2001). Les structures et activités catalytiques sont très proches : ils possèdent tous deux 600 acides aminés, un poids moléculaire similaire (67 kDa pour COX-1 et 72 kDa pour COX-2), les résidus qui forment le canal de liaison au substrat sont identiques et les sites catalytiques et adjacents sont identiques (Hawkey, 1999). La seule variation structurale est attribuable à la substitution d'un seul acide aminé : une isoleucine dans le cas de l'isoforme COX-1 et une valine dans le cas de l'isoforme COX-2 (Bombardier, 2002). Comme l'acide aminé valine est de plus petite taille, ceci va permettre une entrée plus sélective de substrat ou de médicament dans le site de liaison du canal hydrophobe de l'enzyme COX-2.

L'expression et l'induction de ces deux isoformes varient également : l'enzyme COX-1 est exprimée constitutivement dans la plupart des tissus (surtout dans le tractus gastro-intestinal et le rein) et des types cellulaires (surtout dans les cellules endothéliales et les plaquettes), et l'expression de l'enzyme COX-2 est faible, parfois même indétectable, dans la plupart des cellules (Bombardier, 2002). Cependant, l'enzyme COX-2 est inductible par des cytokines, des facteurs de croissance et des hormones lors d'un processus inflammatoire. Les caractéristiques similaires et différentielles des deux isoformes de COX sont schématisées dans la figure 16. Des études récentes ont démontré que COX-1 peut être présente à des sites inflammatoires avec l'enzyme COX-2 (dans les tissus synoviaux) et que son expression peut être régulée (Bombardier, 2002). D'autres études ont démontré que COX-2 peut être exprimée constitutivement comme par exemple dans le cerveau et le rein en condition basale (Bombardier, 2002). De plus, l'inhibition de l'enzyme COX-1 de la muqueuse gastrique normale n'induit pas d'ulcères mais l'inhibition des deux isoformes de COX est nécessaire pour induire des lésions GI. Ces mêmes études ont révélé que COX-2 est impliquée dans certains effets de gastroprotection. Toutes ces études indiquent donc que COX-2 joue un rôle dans la défense et la réparation de la muqueuse gastrique (Peskar *et al.* 2002). Par conséquent, la théorie classique qui distingue COX-1 comme une enzyme constitutive et COX-2

comme une enzyme inductible représente une simplification de la réalité biologique (Mardini et Fitzgerald, 2001; Fitzgerald et Patrono, 2001; Bombardier, 2002).

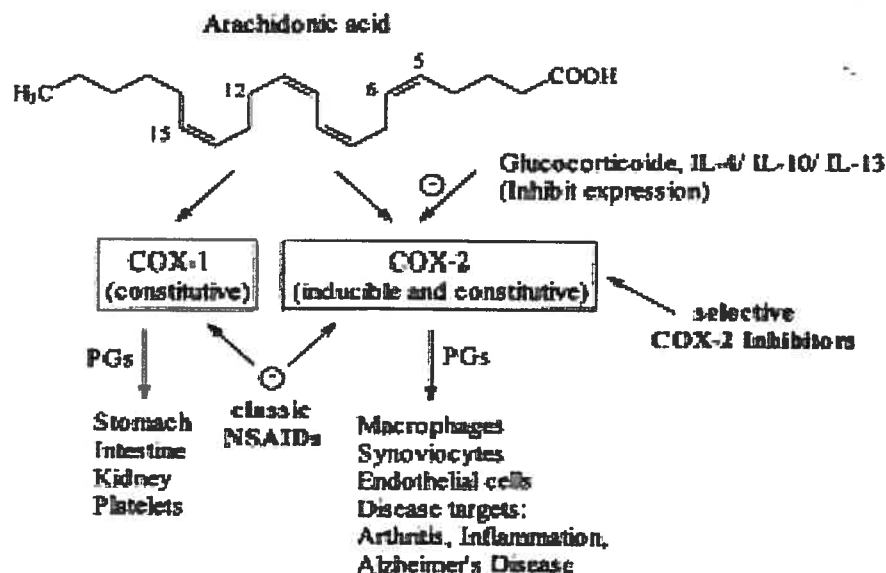


Figure 16: Caractéristiques et rôles des enzymes COX-1 et COX-2 (Dannhardt et Kiefer, 2001).

3.1.2 Les prostaglandines E₂ (ou PGE₂)

Le rôle de PGE₂ comme médiateur de la résorption osseuse est bien établi. En effet, il active l'adénylate cyclase (AC) dans les Obs et des études avec des cultures primaires d'Obs de souris ont indiqué que le PGE₂ peut stimuler l'accumulation des inositols phosphates (IPs) et que cette activation constitue une réponse aux hormones de résorption osseuse (Sandy *et al.* 1991). PGE₂ agit également au niveau de la formation osseuse en tant que régulateur de la prolifération et de la différenciation des Obs (Ren et Dziak, 1991; Paredes *et al.* 2002). Par conséquent, tout comme mentionné précédemment dans la section 2.3.4.3, il semblerait que les concentrations faibles de PGE₂ stimulent la formation osseuse et que les concentrations plus élevées de PGE₂ stimulent la résorption osseuse.

3.2 Les leucotriènes (ou LTs)

Le premier produit (acide 12-hydroxyeicosatetraénoïque ou 12-HETE) dérivé d'une enzyme lipoxigénase, la 12-lipoxigénase, a été caractérisé en 1974. Après cette découverte, l'intérêt pour les produits dérivés des lipoxigénases s'est dissipé pendant plusieurs années jusqu'à la découverte d'une nouvelle lipoxigénase, la 5-lipoxigénase (ou 5-LO), qui avait la capacité de convertir l'AA en LTs. Le terme leucotriène a été choisi parce que ces substances ont été identifiées et purifiées des leucocytes et parce qu'elles contiennent une structure «triène» (Brain et Williams, 1990). Tout comme les PGs, les LTs ne sont pas stockés dans les cellules, mais plutôt synthétisés suite à la libération de l'AA des phospholipides membranaires. Les LTs sont impliqués dans les réactions de défense contre des agents pathogènes et jouent un rôle important dans les maladies inflammatoires comme l'asthme (atteinte des poumons), les réactions allergiques, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, l'infarctus du myocarde, etc.

Dans la membrane nucléaire, l'enzyme 5-LO catalyse deux réactions séquentielles : une oxygénation de l'AA en C-5 en acide 5(S)-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatétraénoïque ou 5-HPETE et une déshydratation du 5-HPETE en un composé époxyde instable, le LTA_4 (Steinhilber, 1994 ; Woods *et al.* 1993; Vickers, 1995 ; Silverman et Drazen 1999; Peters-Golden et Brock, 2003). La figure 17 présente les étapes de biosynthèse des leucotriènes. Les leucotriènes C_4 , D_4 et E_4 sont connus pour être des bronchoconstricteurs et des médiateurs puissants de la perméabilité microvasculaire. Les leucotriènes B_4 sont de puissants agents chemoattractants des leucocytes et des neutrophiles (Brain et Williams, 1990). Ces dernières molécules seront décrites plus en détails dans la section 3.2.3. D'autres propriétés biologiques des leucotriènes incluent l'hypersécrétion muqueuse, la vasoconstriction et la modulation d'un certain nombre de réponses immunitaires (Reid *et al.* 1990).

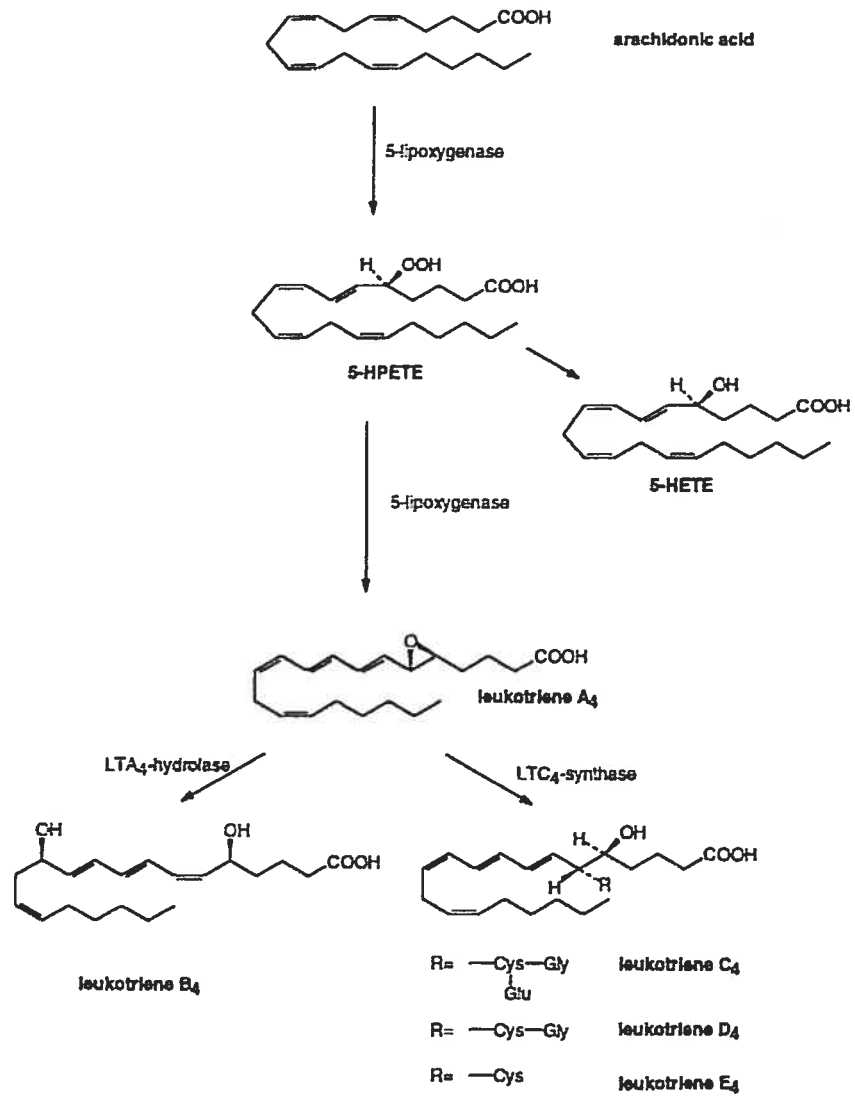


Figure 17 : Voie de biosynthèse des leucotriènes (Steinhilber, 1994)

3.2.1 La 5-lipoxygénase ou 5-LO

La 5-LO est une enzyme soluble de 674 résidus d'acides aminés et de poids moléculaire se situant entre 72 000 et 80 000 (Steinhilber, 1994; Rådmark, 2000; Yopp *et al.* 2003). Elle a été purifiée de plusieurs types de leucocytes. Afin d'obtenir une stimulation maximale dans les cellules intactes (et non dans les homogénats de cellules), elle requiert du calcium et de l'ATP. Bien qu'il ne soit pas indispensable pour une activité enzymatique, le calcium augmente l'hydrophobicité de la 5-LO et facilite l'association membranaire (Rådmark, 2000). Ainsi, en plus de favoriser l'activité enzymatique de la 5-LO, le calcium facilite la translocation de la 5-LO du cytosol à la fraction membranaire. L'ATP, quant à lui, active d'autant plus la 5-LO en présence de calcium (Silverman et Drazen 1999; Rådmark, 2000; Peters-Golden et Brock, 2003). Des études effectuées avec un inhibiteur de la 5-LO, MK-886, a permis de conclure que la translocation de la 5-LO du cytosol à la fraction membranaire est nécessaire pour la synthèse des leucotriènes, car cet inhibiteur bloquait cette translocation sans inhiber directement l'activité de la 5-LO (Silverman et Drazen, 1999; Rådmark, 2000; Peters-Golden et Brock, 2003). MK-886 se liait à une protéine membranaire de 18 kDa appelée «5-lipoxygénase-activating protein» ou FLAP qui a pu être ultérieurement clonée et séquencée. En bref, la 5-LO nécessite du calcium, de l'ATP et la FLAP pour obtenir une activité catalytique maximale.

3.2.2 La 5-lipoxygénase-activating protein ou FLAP

La FLAP est une protéine membranaire de 161 résidus d'acides aminés et de 18 kDa qui possèdent trois domaines transmembranaires (Vickers, 1995; Yopp *et al.* 2003). Elle est reconnue comme faisant partie de la superfamille de protéines appelées «membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism ou MAPEG». Aucune activité enzymatique n'a été associée à cette protéine, comparativement aux autres membres de la superfamille de MAPEG (Peters-Golden et Brock, 2003). La FLAP peut stimuler le métabolisme de l'AA par la 5-LO (mais, elle n'est pas absolument nécessaire). Un fait particulier est que les modifications d'expression de la FLAP

influencent énormément les capacités biosynthétiques cellulaires des LTs (Peters-Golden et Brock, 2003). On a longtemps pensé que les fonctions de la FLAP étaient de servir d'ancrage membranaire pour la 5-LO. Toutefois, une association directe entre la 5-LO et la FLAP n'a jamais été démontrée. Les études faites jusqu'à présent nous amènent à penser que la FLAP jouerait plus un rôle de transfert de substrat ou de présentation du substrat (Steinhilber, 1994; Rådmark, 2000). Un modèle présentant la relation possible qui existerait entre 5-LO et la FLAP est schématisé dans la figure 18. Il a été démontré, grâce à des études réalisées avec des cellules d'ostéosarcome qui exprimaient la 5-LO (et non la FLAP) en présence de calcium que la 5-LO s'associait à la membrane selon une relation dose-dépendante avec la quantité de calcium présente. Néanmoins, aucune biosynthèse de LT n'avait lieu, ce qui signifie que l'association membranaire productive de la 5-LO qui engendrerait la synthèse de LTs est régulée par la FLAP (Vickers, 1995).

D'un point de vue pathologique, il a été constaté que des souris knock-out pour le gène de la FLAP se développaient de façon normale, mais généraient des réponses inflammatoires atténuées qui seraient attribuables à l'absence de production de LTs (Silverman et Drazen, 1999). Plus spécifiquement, un modèle d'arthrite induite chez la souris DBA/1 déficiente en FLAP présentait des réponses inflammatoires aiguës réduites et une remarquable réduction de la sévérité de la maladie comparativement aux souris normales ou hétérozygotes (Griffiths *et al.* 1997). Si l'absence du gène de la FLAP n'affecte pas les fonctions physiologiques mais prévient, du moins en partie, la réponse inflammatoire aiguë, une thérapie génique pourrait constituer un outil thérapeutique intéressant pour des pathologies comme l'arthrose/l'arthrite.

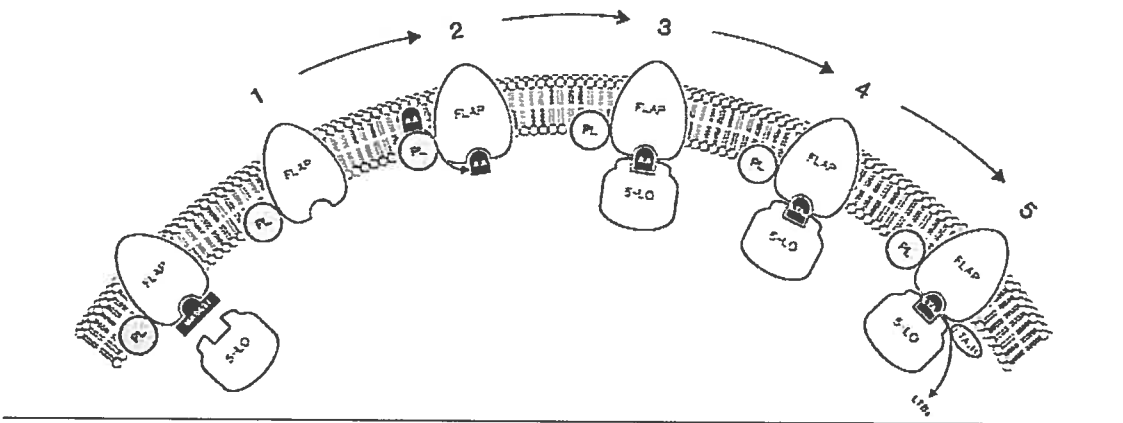


Figure 18 : Modèle possible démontrant la relation existant entre 5-LO et FLAP (Vickers, 1995)

3.2.3 Les leucotriènes B₄ (ou LTB₄)

Le leucotriène B₄ (ou acide 5S, 12R-dihydroxy-6,14-*cis*-8,10-*trans*-eicosatetraenoïque) a été isolé et purifié en 1978 à partir de neutrophiles (Crooks et Stockley, 1998). Comme mentionné précédemment, le LTB₄ est un puissant agent chémoattractant pour les leucocytes et les neutrophiles *in vitro*. *In vivo*, il possède également une activité chémoattractante et induit une augmentation de la perméabilité microvasculaire par les neutrophiles. De façon plus générale, il peut induire de l'œdème (phénomène qui peut être amplifié en présence d'un facteur vasodilatateur comme le PGE₂). Il est également un stimulateur de l'agrégation des leucocytes polymorphonucléaires (PMNs) (Brain et Williams, 1990). Cette molécule possède donc la capacité de contrôler la douleur (en amplifiant la réponse inflammatoire avec l'action migratoire des neutrophiles) et de réguler le système immunitaire. Le LTB₄ serait aussi impliqué dans la résorption osseuse (Ren et Dziak, 1991). Cependant, le mécanisme et les cellules impliquées dans cette dernière action restent à être déterminés. Le LTB₄ est le ligand d'un système de deux récepteurs, nommés BLT1 et BLT2, faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. D'ailleurs, ces récepteurs ont été analysés dans des cas normaux et OA (dans notre laboratoire) et aucun aspect différentiel n'a été révélé (Paredes *et al.* 2002).

Parmi les cellules humaines, les macrophages alvéolaires et péritonéales, et les monocytes produisent du LTB₄ (Ford-Hutchinson, 1990). De petites quantités de LTB₄ sont aussi détectées dans le fluide synovial de cas d'arthrite rhumatoïde. Plus récemment, des données obtenues par notre laboratoire ont indiqué que les Obs OA produisaient du LTB₄ (Paredes *et al.* 2002).

4. LES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES ACTUELLES

Il n'y a présentement aucune cure pour la pathologie de l'OA. Le but des traitements thérapeutiques actuels est de contrôler la douleur et les autres symptômes, de maintenir et/ou d'améliorer la fonction de l'articulation et la qualité de vie des personnes atteintes. Afin d'obtenir un traitement optimal, il faut combiner un ou des traitements pharmacologiques à un ou des traitements non-pharmacologiques (Felson, 2000; Leslie, 2000; Hinton *et al.* 2002; Hogues et Mersfelder, 2002). Les traitements pharmacologiques peuvent être subdivisés en 2 catégories: les traitements systémiques et les traitements locaux (Felson, 2000; Haq *et al.* 2003).

4.1 Les traitements pharmacologiques

4.1.1 Les traitements systémiques

Les traitements systémiques comprennent: les analgésiques non-opioïdes (Acétaminophène, Tramadol, etc.), les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (COXIBS), les analgésiques opioïdes, la glucosamine et la chondroïtine sulfate (suppléments alimentaires: monosaccharides aminés et substrats des glycosaminoglycane et des protéoglycane du cartilage articulaire qui sont produits naturellement par notre système et qui sont impliqués dans le maintien et la réparation du cartilage).

4.1.1.1 Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont les médicaments les plus prescrits dans le monde (Fitzgerald et Patrono, 2001; Bombardier, 2002). On estime que 33 millions d'américains utilisent régulièrement un AINS et 40% de ceux-ci sont des sujets âgés. Ils représentent le traitement de choix contre l'arthrose avec douleur inflammatoire, contre l'arthrite rhumatoïde et contre les dysménorrhées (Fitzgerald et Patrono, 2001). Il existe plus de 50 différents AINS sur le marché actuel et leurs actions pharmacologiques majeures

comprennent des effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (bien que le degré d'activité anti-inflammatoire varie d'un AINS à l'autre). Les AINS disposent donc d'un avantage non négligeable: celui de posséder trois actions pharmacologiques dans un seul médicament. De façon générale, tous ses effets sont intimement reliés au mécanisme d'action primaire de ces médicaments qui est: l'inhibition de l'action des enzymes COX (COX-1 et COX-2) et, par le fait même, de la production des PGs et des thromboxanes. Il existe plusieurs classes d'AINS (qui sont répertoriées dans le tableau IV).

Tableau IV : Les différentes classes d'AINS

Classe d'AINS	Exemples de médicament
Salicylés	L'acide acétylsalicylique ou aspirine et le diflunisal
Indolés	L'indométhacine, le sulindac et le kétorolac
Pyrazolés	Le phénylbutazone
Fénamates	L'acide méfénamique
Dérivés de l'acide propionique	L'ibuprofen, le naproxen, le ketoprofen, etc.
Benzothiazines ou oxicams	Le piroxicam et le meloxicam
Para-aminophénols *	L'acétaminophène

* Cette classe de médicament possède peu ou pas d'activité anti-inflammatoire

Les effets secondaires gastro-intestinaux (GI) des AINS

Malgré leur efficacité prouvée comme anti-inflammatoires, les AINS possèdent un facteur limitant majeur à leur utilisation; il s'agit de leur association à une toxicité GI. Leurs effets GI comprennent des symptômes plus communs de nuisance comme la dyspepsie, des douleurs abdominales, des brûlures d'estomac, des nausées ou des vomissements, ou encore des effets plus inhabituels comme des lésions de la muqueuse gastrique visibles par endoscopie, ou encore des complications GI plus graves comme des ulcères gastriques ou duodénaux ou même des saignements ulcéreux (Fitzgerald et

Patrono, 2001; Bombardier, 2002). Lors de l'utilisation à long terme d'AINS, la progression biologique d'une érosion GI débute par une simple érosion, progresse ensuite par un ulcère symptomatique et un saignement ulcéreux et peut s'aggraver à un tel point qu'elle entraîne la mort par saignement ulcéreux prononcé.

Aux États-Unis, les cas majeurs de toxicité GI associée aux AINS résultent en 103 000 hospitalisations et 165 000 morts par année. Le risque relatif de perturbation GI de la population utilisant régulièrement un AINS est trois fois plus élevé que le risque relatif d'une population n'utilisant pas régulièrement un AINS (Bombardier, 2002). De plus, le second facteur qui aggrave ces dommages GI est le fait surprenant qu'un utilisateur chronique sur 5 possédait des dommages silencieux qui représentaient un risque faible (quoique définitif) d'hémorragie sérieuse ou de saignement ulcéreux. En d'autres termes, il est très difficile de détecter ou de diagnostiquer un dommage GI chez ces utilisateurs d'AINS, car les symptômes sont silencieux chez 80% de ces patients et ce, même si l'érosion GI est à un stade plus ou moins avancé. Il serait donc primordial de trouver une alternative plus sécuritaire pour les patients à risque.

4.1.1.2 Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (COXIBS)

Cela fait maintenant 5 ans que les COXIBS sont utilisés comme médicaments anti-inflammatoires. Les analystes financiers prédisaient que cette nouvelle classe de médicaments anti-inflammatoires deviendrait les meilleurs vendeurs des industries pharmaceutiques. Deux COXIBS sont présentement largement utilisés dans le milieu clinique : Rofecoxib (dont le nom commercial est Vioxx de la compagnie Merck, 1999) et Celecoxib (dont le nom commercial est Celebrex de la compagnie Monsanto, 1998) (Mardini et Fitzgerald, 2001). Rofecoxib a été approuvé pour le soulagement des signes et des symptômes d'OA, la prise en charge de la douleur aigue chez des adultes et le traitement de dysménorrhée primaire par le US Food and Drug Administration (FDA) (Bombardier, 2002). Celecoxib a été approuvé pour le soulagement des signes et des symptômes d'OA et d'arthrite rhumatoïde (RA), la prise en charge de la douleur aigue chez des adultes et le traitement de dysménorrhée primaire par le FDA (Bombardier,

2002). L'avantage clinique des COXIBS comparativement aux AINS vient du fait qu'ils inhibent majoritairement ou complètement l'activité COX-2 en produisant que peu ou pas d'inhibition de l'activité COX-1. Ceci favorise une action sélective aux sites inflammatoires et affecte moins les processus non-inflammatoires des PGs qui sont produits via l'isoforme COX-1 (comme par exemple, dans l'estomac, le rein, les plaquettes etc.). De plus, des études effectuées sur des modèles animaux d'inflammation ont démontré qu'à des doses appropriées, une efficacité comparable est observée entre les COXIBS Rofecoxib et Celecoxib et les AINS conventionnels (Mardini et Fitzgerald, 2001).

Donc, à première vue, les COXIBS semblent avoir plus de mérites que les AINS typiques : ciblage des sites inflammatoires pour leur action anti-inflammatoire et efficacité comparable aux AINS et une réduction de l'incidence d'événements GI graves qui peuvent aller jusqu'à 50% comparativement aux AINS typiques (selon deux grandes études cliniques qui comprenaient un nombre élevé de patients: Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research ou VIGOR et Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study ou CLASS) (Mardini et Fitzgerald, 2001; Fitzgerald et Patrono, 2001; Bombardier, 2002; Hawkey, 2002). Néanmoins, ils seraient associés à d'autres effets secondaires, tels qu'une toxicité rénale significative, des effets pro-thrombotiques et des effets hypertensifs.

4.1.1.3 Les nouveaux produits thérapeutiques en essai

Ces dernières années, le domaine thérapeutique de l'inflammation a analysé deux nouveaux types de médicaments potentiels: les inhibiteurs doubles de COX/5-LO et les NO-AINS. Comme l'oxyde nitrique (NO) est maintenant reconnu comme un médiateur critique de la défense de la muqueuse GI en effectuant les mêmes actions que les PGs dans le tractus GI (régulation du débit sanguin de la muqueuse gastrique, libération de mucus, réparation des dommages de la muqueuse, inhibition de l'adhérence des neutrophiles, etc.), les NO-AINS ont été proposés afin de réduire la toxicité GI (Wallace et Del Soldato, 2003). Les NO-AINS sont des agents chimiques stables qui sont

synthétisés par estérification d'une molécule NO à un AINS typique comme l'Aspirine, le Naproxen, le Diclofenac, l'Ibuprofen, etc. Dans les tissus biologiques, la libération du NO se fait à l'aide d'une enzyme dont on soupçonne que son identité est une estérase (Wallace et Del Soldato, 2003). Il est évident que les modifications chimiques des AINS ne doivent pas interférer avec leur capacité d'action primaire qui est d'inhiber l'activité COX. Ce fait a été vérifié par plusieurs études sur les rats et par 2 grandes études cliniques qui ont corroboré les résultats obtenus dans les études faites avec les modèles animaux (Wallace et Del Soldato, 2003).

Dans la première étude clinique, la comparaison des effets sécuritaires d'un NO-Aspirine, le NCX-4016, a été faite avec l'aspirine et un placebo : le NCX-4016 administré deux fois par jour pendant une semaine n'a pas produit de dommages gastriques (les évaluations endoscopiques étaient les mêmes que celles du groupe placebo), tandis que les doses de 200 et de 450 mg d'aspirine ont produit des dommages gastriques étendus (Wallace et Del Soldato, 2003). Dans la seconde étude, le profil sécuritaire d'un NO-Naproxen (AZD3582) a été analysé et deux administrations de ce NO-AINS par jour a produit 72% moins de dommages gastriques chez des volontaires sains que la dose équivalente de Naproxen (Wallace et Del Soldato, 2003). Les premières découvertes expérimentales ont été réalisées dans des modèles animaux aigus et chroniques et ils ont démontré que les NO-AINS ont la capacité de «défendre» le tractus GI. Les mêmes constatations ont été faites avec le NO-Aspirine, le NO-Indomethacin et le NO-ketoprofen (Wallace et Del Soldato, 2003).

Les inhibiteurs doubles de COX/5-LO ont été développés sous le principe que l'inhibition prolongée des enzymes COX pouvait induire un «court-circuit» de la voie de production de PGs vers la voie de production des LTs par l'enzyme 5-LO. Cette situation serait encore plus problématique, car comme décrit précédemment, les LTs aussi sont des puissants médiateurs de l'inflammation (en recrutant et en activant les cellules inflammatoires au site même de l'inflammation) et des agents chémoattractants des neutrophiles et des macrophages, etc. (Martel-Pelletier *et al.* 2003). Par conséquent, ils amplifieraient la réaction inflammatoire. Il a alors été suggéré qu'une inhibition des

deux voies était nécessaire afin d'obtenir une activité anti-inflammatoire optimale. D'ailleurs, une étude *in vivo* de Nickerson-Nutter et Medvedeff (1996) a corroboré cette hypothèse en démontrant que des inhibiteurs de la synthèse de LTs, Bay-X 1005, Bay-X 1015 et Zileuton, ont été incapable de réduire l'inflammation associée à l'arthrite lorsqu'ils étaient administrés seuls dans des modèles d'arthrite induite de façon aiguë ou chronique chez la souris. Néanmoins, lorsque ces inhibiteurs étaient co-administrés avec un inhibiteur de la synthèse de PGs, le Naproxen, une inhibition significative de l'inflammation associée à l'arthrite a été observée chez les animaux (Nickerson-Nutter et Medvedeff, 1996). Il y a également l'étude de Paredes *et al.* (2002) qui a démontré *in vitro* un niveau quatre fois plus élevé de LTB₄ lorsque des ostéoblastes humains provenant de la plaque sous-chondrale avait été traités de façon chronique avec un inhibiteur spécifique de COX-2 (NS-398 à une concentration de 10 µM). À ce jour, quelques inhibiteurs doubles ont été développés, mais leur utilisation a été abandonnée due à des effets secondaires de toxicité hépatique (Wong *et al.* 1992).

Parmi les inhibiteurs doubles de COX/LO à l'étude, Tepoxalin en est un exemple qui possède une activité anti-inflammatoire potentielle avec une excellente tolérance GI dans des modèles animaux qui avaient été traités pour des périodes prolongées à des doses plus élevées que celle requise pour produire les effets anti-inflammatoires (Knight *et al.* 1996; Argentieri *et al.* 1994). Quelques études chez des humains ont révélé que Tepoxalin inhiberait COX et LO après une administration orale qui pouvait aller jusqu'à 800 mg (Waldman *et al.* 1996). Licofelone (ou anciennement appelée ML3000) représente un autre exemple d'inhibiteur double de COX et de LO présentement en phase III de développement clinique et il n'a présenté aucun profil d'hépatotoxicité dans les études pré-cliniques ou cliniques (Laufer S. A. *et al.* 1994; Laufer *et al.* 1995; Wallace *et al.* 1994). Son ratio d'inhibition de cyclooxygénase/5-lipoxygénase s'approche de 1 (Laufer S. *et al.* 1994; Bertolini *et al.* 2001). Dans des modèles animaux, Licofelone a démontré des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et anti-pyrétiques à des doses qui ne causent pas de dommages GI. Il a été étudié en comparaison avec Indométhacin et Diclofénac pour des doses uniques et

répétées chez des modèles animaux et les résultats ont indiqué que Licofelone génère des dommages gastriques minimaux (Wallace *et al.* 1994; Tries *et al.* 2002).

En définitive, les nouveaux produits en étude clinique (les inhibiteurs doubles de COX et LO et les NO-AINS) présentent un profil prometteur jusqu'à maintenant et semble être plus sécuritaire lors de traitements à long terme. Il va sans dire que des études supplémentaires seront nécessaires afin de bien déterminer son profil de sécurité dans des cas d'administration prolongée, toutefois, de façon générale, plusieurs études (de modèles animaux ou d'essais cliniques) supportent la notion que le NO-AINS provoquent beaucoup moins de dommages au tractus GI que l'AINS parent correspondant, et cela, autant dans les cas d'administration aiguës que dans les cas d'administration chroniques. Les inhibiteurs doubles de COX/LO présentent aussi un profil pharmacologique GI sécuritaire, toutefois, le mécanisme par lequel il protège le tractus GI n'est pas encore bien établi.

4.1.2 Les traitements locaux

Les traitements locaux sont généralement des analgésiques d'usage topique comme la crème de capsaïcine, utilisés dans le traitement de la douleur légère à modérée (Felson, 2000; Haq *et al.* 2003).

Dans les cas d'OA du genou chez des patients pour lesquels les AINS et les traitements non-pharmacologiques se sont avérés inefficaces (et seulement si les patients en question ne possèdent pas d'antécédents de maladies ou d'atteintes gastro-intestinales : ulcères ou saignements, etc.), l'injection intra-articulaire d'acide hyaluronique est un traitement alternatif. L'acide hyaluronique (HA) est un composant majeur du liquide synovial et du cartilage qui pourrait servir comme lubrifiant articulaire en améliorant la visco-élasticité du fluide synovial (Leslie, 2000; Hinton *et al.* 2002; Haq *et al.* 2003). Par ailleurs, leur effet dure habituellement moins de 4 semaines et elle peut être administrée de 3 à 4 fois par année. Les injections intra-articulaires de stéroïdes constituent une autre option alternative pour le même type de patient pour diminuer la

douleur articulaire et augmenter la force musculaire du quadriceps (Leslie, 2000; Hinton *et al.* 2002).

4.2 Les traitements non-pharmacologiques

L'activité physique, la perte de poids, l'acupuncture et l'utilisation de chaussures orthopédiques font partie de la catégorie de traitements non-pharmacologiques (Felson, 2000; Leslie, 2000; Haq *et al.* 2003). Comme mentionné précédemment, un ou plusieurs de ces choix doivent être combinés aux traitements pharmacologiques afin d'obtenir des résultats optimaux.

5. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Les traitements actuels de l'arthrose se limitent à contrôler la douleur afin de maintenir et/ou d'améliorer la fonction de l'articulation et la qualité de vie des personnes atteintes. Les médicaments soulageant l'OA, agissent sur les enzymes COX 1 et/ou 2 pour inhiber la production de prostaglandines (PGs), à partir de l'acide arachidonique. À long terme, cette inhibition pourrait produire un «court-circuit» vers l'activation de l'enzyme 5-lipoxygénase (5-LO) qui produit des leucotriènes. Ces leucotriènes sont considérés comme des amplificateurs de l'inflammation. Notre laboratoire a déjà démontré que les ostéoblastes de l'os sous-chondral (Obs OA) produisent des niveaux variables de PGE₂ et de LTB₄ et qu'une relation inverse existait entre ces niveaux de production, néanmoins les mécanismes impliqués demeurent encore inconnus.

Notre hypothèse de travail est que la production de PGE₂ est le moteur qui contrôle celle des leucotriènes, i.e. que la production de PGE₂ va inhiber celle des leucotriènes. En corollaire, ceci suggère que l'inhibition de la synthèse de PGE₂ lèverait le frein à celle de LTB₄. L'objectif de cette recherche est donc de déterminer le ou les facteur(s) responsable(s) de la régulation de ce «cross-talk» entre les voies de PGE₂ et de LTB₄ dans les Obs de l'os sous-chondral humain chez des patients OA. Plus spécifiquement, les objectifs seront de :

- 1) Déterminer *in vitro* les niveaux d'expression et de synthèse de la 5-LO et de la FLAP dans les Obs OA et comparer ces niveaux à ceux des Obs normaux.
- 2) Comparer la régulation des niveaux d'expression et de synthèse de la 5-LO et de la FLAP des Obs OA aux niveaux d'expression et de synthèse des Obs normaux, grâce à des stimulations par différents effecteurs.
- 3) Déterminer si la régulation de ces niveaux expression et de synthèse discrimine les patients OA en deux populations, tout comme démontré antérieurement dans le cas des niveaux de production inverse de PGE₂ et de LTB₄.
- 4) Déterminer si IL-10 ou IL-18 régule la communication entre les voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄ chez les patients atteints d'OA.

Cette étude pourrait indiquer les modifications requises aux traitements médicamenteux actuels ainsi que les conditions nécessaires pour favoriser l'inhibition plus ou moins complète de la douleur associée à la composante inflammatoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Patients et paramètres cliniques

Des spécimens de plateaux tibiaux provenant de patients atteints d'OA ont été obtenus pour un total de 18 patients (3 hommes et 15 femmes) âgés de 68 ± 7.6 ans (moyenne \pm écart-type). Ces patients avaient subi une opération de remplacement total du genou. Ces patients ont été classifiés comme atteints d'arthrose (de modéré à sévère) selon des critères cliniques reconnus et recommandés par l'American College of Rheumatology (Altman *et al.* 1986)

Des spécimens de plateaux tibiaux provenant d'individus normaux ont été obtenus pour un total de 11 patients (8 hommes et 3 femmes) âgés de 61 ± 21.2 ans (moyenne \pm écart-type). Ces plateaux ont été prélevés à l'autopsie chez des individus moins de 16 heures après la mort. Les individus qui présentaient une détérioration du cartilage et/ou une certaine sclérose de l'os, ou qui possédaient des pathologies pouvant affecter l'os (ostéoporose, maladie de Paget, etc.) et ceux qui avaient subi de la chimiothérapie pour n'importe quel type de cancers ont été exclus. Tout le matériel humain a été acquis après vérification de l'accord signé des patients ayant subi l'opération de remplacement du genou ou de la parenté pour les spécimens recueillis à l'autopsie suivant les règlements du comité d'éthique du centre de recherche du CHUM.

Extraction de l'explant sous-chondral et préparation de la culture primaire de cellules d'ostéoblastes

Le plateau tibial médial a été extrait dans des conditions stériles pour préparer l'explant et la culture primaire de cellules ostéoblastes comme suit: le cartilage à la surface de l'os a été retiré et l'explant a été disséqué de la portion centrale du plateau tibial. L'os trabéculaire a été enlevé de l'explant d'os sous-chondral. Toutes ces dernières étapes ont été effectuées à l'aide d'un microscope magnifiant.

Suite à plusieurs lavages de l'explant d'os sous-chondral pour éliminer les traces de sang, l'explant est découpé en plusieurs fragments d'os d'une taille d'environ 2 mm². Par la suite, ceux-ci sont incubés avec 1 mg/mL de collagénase de type I (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) dans du milieu Ham's F-12 / Dulbecco's modified Eagle's ou DMEM F12 (Sigma-Aldrich) pour trois digestions séquentielles de 30, 30 et 240 minutes, afin d'enlever les cellules adhérentes et les cellules résiduelles de la moelle osseuse. Les fragments d'os sont ensuite mis en culture dans des flacons T25 dans du milieu Biggers, Gwatkin and Judah (BGJ; Sigma-Aldrich) contenant 20% de sérum de veau fœtal (SVF, Wisent Inc., Saint-Bruno, Québec ou BioWhittaker, Walkerville, MD, USA). Ce milieu a été remplacé chaque 2 jours jusqu'à l'apparition de cellules dans les flacons. À partir de cette observation, le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf contenant 10% de SVF. À l'obtention de la confluence, les cellules subissent un seul passage à raison de 25 000 cellules par cm² dans un milieu DMEM F12 contenant 10% de SVF et croissent pendant 5 jours jusqu'à atteinte de la confluence de nouveau. Les traitements débutent alors suivant les protocoles qui suivent.

Stimulation des ostéoblastes à différents facteurs

Les ostéoblastes à confluence ont été traités avec 50 nM de 1,25(OH)₂D₃ (un généreux cadeau du D^r Uskokovic, Hoffman-Laroche, Nutley, NJ), avec 10 ng/mL de TGF-β1 (R&D Systems, Abingdon, Royaume-Uni), avec les deux facteurs combinés, ou avec 1 µg/mL d'un anticorps au récepteur de TGF-β1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), avec 500 nM de PGE₂ (Sigma-Aldrich), avec 10 µM de NS-398 (Calbiochem, San Diego, CA) ou en présence des diluants seulement (pour représenter les conditions contrôles) pendant 48 heures en présence de DMEM F12 contenant 0.5% de SVF. Une quantité de 20 nM d'ionomycine (Calbiochem, San Diego, CA) a été ajoutée 24 heures avant la récolte des cellules pour activer la synthèse de LTB₄ qui requiert du Ca²⁺. À la fin de l'incubation, les surnageants ont été récupérés et conservés à -20 °C jusqu'au jour des essais EIA (décrits un peu plus loin). Les cellules ont été lavées au PBS deux fois, récupérées dans une solution lytique de TRIzol (Gibco BRL, Burlington, Ontario,

Canada) pour l'extraction d'ARN et la préparation pour le RT-PCR («Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction») ou dans du tampon de radioimmunoprécipitation ou RIPA (Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% Niodet P-40 ou NP-40, 0,5% Na-deoxicholate et 0,1% SDS avec les inhibiteurs suivants : 10 µg/ml Aprotinine, 10 µg/ml Leupeptine, 10 µg/ml Pepstatine, 10 µg/ml O-phenantroline, 1 mM Na-orthovanadate et 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride ou PMSF) pour la préparation des analyses d'immunobuvardage et pour le dosage de protéines par la méthode d'acide bicinchoninique ou BCA (Smith *et al.* 1985). Tous ces lysats cellulaires ont été conservés à -80 °C.

En ce qui a trait à la préparation des échantillons pour les analyses d'immunobuvardage permettant de détecter la FLAP, la préparation d'extraits nucléaires est requise. Toutes les étapes qui suivent ont été entreprises selon la méthode légèrement modifiée de McCarthy *et al.* (1997) à 4°C ou sur glace. À la fin de l'incubation des cellules stimulées, les cellules ont été lavées au PBS deux fois et récupérées dans du PBS à l'aide d'un grattoir à cellules. Les cellules récupérées sont ensuite centrifugées pendant 2 minutes à 4°C à 12 000 g. Suite à cela, le culot cellulaire a été lavé au PBS deux fois et le milieu a été centrifugé de nouveau pendant 2 minutes à 4°C à 12 000 g. Par la suite, le culot de cellules a été lysé dans une solution hypotonique de lyse cellulaire (10 mM HEPES (pH 7.4), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT) contenant des inhibiteurs de phosphatases (1 mM sodium orthovanadate, 10 mM fluorure de sodium) et des inhibiteurs de protéases (0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride ou PMSF, 1 µg/ml pepstatin A, 2 µg/ml leupeptin et 2 µg/ml aprotinin; Sigma) et 1% Triton X-100. La libération des protéines nucléaires solubles a été effectuée lors d'une incubation de 30 minutes à 4°C avec agitation légère, suivie par une centrifugation pendant 2 minutes à 4°C à 12 000 g. Finalement, le culot contenant les protéines nucléaires solubles a été resuspendu dans le tampon RIPA décrit précédemment. Ces extraits nucléaires ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Vérification du phénotype des ostéoblastes sous-chondraux humains des cultures primaires

Deux marqueurs phénotypiques des ostéoblastes ont été évalués: la phosphatase alcaline ou ALPase et la relâche d'ostéocalcine ou OC qui sont tout deux dépendantes de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50 nM). L'activité de la phosphatase alcaline a été évaluée sur les lysats cellulaires en mesurant l'hydrolyse de son substrat, la p-nitrophénylphosphate ou pNPP incolore en p-nitrophénol ou pNP coloré en jaune et détecté par spectrophotométrie à 405 nm. La relâche d'ostéocalcine a été mesurée dans les surnageants par dosage EIA (R&D Systems) tel que décrit dans Lajeunesse *et al.* (1991) et Lajeunesse *et al.* (1996).

Dosage de PGE₂, LTB₄, IL-10 et IL-18

Les niveaux de production de PGE₂ et de LTB₄ ont été déterminés dans les surnageants cellulaires récupérés en utilisant un dosage EIA spécifique (EIAs; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Leur spécificité et limite de détection respectives sont 100% et 13 pg/mL et 100% et 15 pg/mL. Le niveau de production de IL-10 a aussi été quantifié dans les surnageants cellulaires en utilisant un kit de dosage ELISA spécifique (R&D Systems). Sa sensibilité ou limite de détection est de 0.5 pg/mL et sa spécificité est de 100% pour l'IL-10 naturel ou recombinant humain. Finalement, le niveau de production de IL-18 a été également déterminé dans les surnageants cellulaires grâce à un kit de dosage ELISA spécifique (MBL Co Ltd., Nagoya, Japon). Sa sensibilité ou sa limite de détection est de 12.5 pg/mL.

«Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction» ou RT-PCR semi-quantitatif de la 5-Lipoxygenase (5-LO) ou de la 5-Lipoxygenase-Activating Protein (FLAP)

L'ARN total a été extrait par la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987) et quantifié selon la procédure utilisant la technique de marquage avec RiboGreen en suivant les recommandations du manufacturier (Cederlane, Hornby, Canada). Une quantité de 2 µg d'ARNm a été utilisée pour la transcription

inverse en ADN avant le PCR. Le PCR est amorcé en présence de 20 μ mol d'une amorce 5-LO sens « 5'-CTG-TTC-CTG-GGC-ATG-TAC-CC-3' » et 5-LO antisens « 5'-GAC-ATC-TAT-CAG-TGG-TCG-TG-3' » ou en présence de 20 μ mol d'une amorce FLAP sens « 5'-AAT-GGG-AGG-AGC-TTC-CAG-AG-3' » et FLAP antisens « 5'-ACC-AAC-CCC-ATA-TTC-AGC-AG-3' ». La réaction d'amplification a été effectuée avec 37 cycles (portion linéaire pour la FLAP). La GAPDH (enzyme de « house-keeping » ou ubiquitaire) a aussi été amplifiée en utilisant 20 μ mol d'amorce sens « 5'-CAG-AAC-ATC-ATC-CCT-GCC-TCT-3' » et antisens « 5'-GCT-TGA-CAA-AGT-GGT-GGT-TGA-3' » en utilisant seulement 27 cycles d'amplification. Les ADNc amplifiés sont ensuite séparés sur un gel d'agarose 1.2% par une électrophorèse d'une heure à 100 Volts. Les bandes d'ADNc sont visualisées à la lumière ultra-violet (UV) grâce à la coloration du gel d'agarose au bromure d'éthidium. L'analyse densitométrique des bandes a été effectuée avec un ChemiImager 4000 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Les résultats sont donc présentés en tant qu'expression relative de 5-LO ou de FLAP normalisé avec celle du gène ubiquitaire GAPDH.

PCR quantitatif de la FLAP (PCRq)

La quantification en temps réel de l'ARNm de FLAP et de GAPDH a été réalisée dans le système GeneAmp 5700 Sequence Detection (Applied Biosystems, Foster City, CA) avec le milieu réactionnel 2X Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Mississauga, ON) selon les recommandations du manufacturier. En bref, une quantité de 100 ng d'ADNc, préalablement obtenue après une RT, a été amplifiée dans un volume total de 50 μ l comprenant le milieu réactionnel Master Mix 1X, l'uracil-N-glycosylase ou UNG à raison de 0.5 U (Epicentre Technologies, Madison, WI) et les amorces spécifiques aux gènes (décrits précédemment) à une concentration finale de 200 nM. L'UNG a été inclus dans le milieu réactionnel afin de prévenir l'amplification croisée d'ADN contaminant.

La séquence des événements de la réaction d'amplification est la suivante : une incubation de 2 minutes à 50 °C (réaction de UNG), ensuite à 95 °C pour 15 minutes (pour l'inactivation de UNG et l'activation de la Taq polymérase) suivie de 40 cycles consistant chacun aux étapes de dénaturation (94 °C pendant 15 secondes), d'hybridation (60 °C pendant 30 secondes), d'extension des brins (72 °C pendant 30 secondes) et d'enregistrement des données (77 °C pendant 15 secondes). Les données obtenues ont été sauvegardées et traitées avec le logiciel GeneAmp 5700 SDS. Elles ont été rapportées en « threshold cycle » (C_t), correspondant au nombre de cycle de PCR requis pour détecter pour la première fois une augmentation dans la fluorescence supérieure à la ligne de base du signal.

Les ADNs plasmidiques contenant les séquences des gènes cibles ont été utilisés pour générer des courbes standard. Afin de comparer les niveaux d'expression de base des cas normaux et OA, les C_t ont été convertis en nombre de molécules et la valeur pour chaque échantillon a été calculée en ratio du nombre de molécules du gène cible/ nombre de molécule de GAPDH correspondante.

Immunotransfert Western de la FLAP

Les extraits nucléaires préalablement récoltés dans le tampon RIPA ont été chargés (30 ou 40 µg/puits) sur gel de polyacrylamide 12% et séparés par électrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes à 200 volts pendant 75 minutes suivant la méthode de Sambrook *et al* (1989). Le chargement des protéines a été ajusté selon la concentration cellulaire en protéine de chaque spécimen. À la fin de l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PDVF) (Boehringer Mannheim, Penzberg, Germany) à 150 volts pendant 75 minutes. Après avoir été bloquées dans du lait écrémé 5% dans TTBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween® 20, pH 7.6) pendant une période minimale de 2 heures, les membranes ont été séquentiellement incubées avec agitation pendant toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire: antisérum

polyclonal anti-FLAP IgG de lapin (dilution 1 :2000, un généreux cadeau de Merck Frosst Canada), lavées dans du TTBS 1X, puis incubées avec un anticorps secondaire lié une peroxydase (horseradish-peroxydase): chèvre anti-lapin IgG (dilution 1 :20 000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). La détection de bandes a été visualisée avec le kit ECL-plus (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) selon les directives du manufacturier. Les analyses de densitométrie ont été effectuées avec un ChemiImager 4000.

Analyses statistiques

Toutes les données quantitatives sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les données ont été analysées par le test t de Student ou par ANOVA. Les valeurs correspondant à $p < 0.05$ ont été considérées comme étant statistiquement significatives.

RÉSULTATS

Phénotype des ostéoblastes sous-chondraux humains

Afin de vérifier si les cellules mises en culture étaient bien des ostéoblastes, deux marqueurs phénotypiques ont été évalués: la phosphatase alcaline ou ALPase et la relâche d'ostéocalcine ou OC qui sont tous deux dépendantes de la 1,25(OH)₂D₃ (50 nM). Après la stimulation des Obs par la 1,25(OH)₂D₃, l'activité enzymatique moyenne quantifiée de l'ALPase des Obs OA était de 1333.1 ± 215.7 nmol/mg comparativement à 616.9 ± 105.1 nmol/mg dans les Obs normaux ($p < 0.005$). Dans les mêmes conditions de stimulation, la quantité moyenne d'OC relâchée des Obs OA était de 264.0 ± 28.3 ng/mg comparativement à 173.7 ± 28.3 ng/mg dans les Obs normaux ($p < 0.05$). L'activité enzymatique de l'ALPase et la relâche d'OC dans les Obs sous-chondraux humains sont présentées dans la figure 19. L'activité enzymatique moyenne de l'ALPase des Obs OA était d'environ 2 fois plus élevée que celle des Obs normaux, tandis que la relâche moyenne d'OC des Obs OA était d'environ 1.5 fois plus élevée que celle des Obs normaux. Une fois que l'on s'était assuré que nous avions bel et bien des Obs en culture, ces derniers étaient utilisés pour nos analyses subséquentes.

Caractérisation des populations de patients OA par la production de PGE₂ et de LTB₄.

Les travaux antérieurs du laboratoire ont démontré l'existence de deux populations de patients OA basées sur la production de PGE₂, de IL-6 et de LTB₄ par les Obs sous-chondraux isolés de plateaux tibiaux. La production de PGE₂ et d'IL-6 étaient similaires à l'intérieur d'une population et permettait de distinguer des patients avec des niveaux élevés (OA 2 ou OA High) ou avec des niveaux similaires (OA 1 ou OA Low) aux Obs des individus normaux (Massicotte *et al.* 2002). L'existence de ces deux populations de patients OA avait également été identifiée grâce aux caractéristiques suivantes: une population dont le niveau de PGE₂ est similaire au taux des patients normaux et dont le niveau de LTB₄ est élevé (OA 1), l'autre population, dont le niveau

de PGE₂ est plus élevé que le taux des patients normaux et dont le niveau de LTB₄ est faible (OA 2). Ainsi, la production de LTB₄ par ces deux populations était inversée par rapport à celle de PGE₂ et démontrait un «court-circuit» entre les deux voies de synthèse de COX et de 5-LO (Paredes *et al.* 2002). Pour la présente étude, nous avons donc caractérisé nos deux populations par des mesures de PGE₂ et de LTB₄ libérés par les Obs OA. Les valeurs obtenues étaient respectivement de 966.4 ± 124.8 et de 146.1 ± 93.0 pour les individus normaux, de 982.6 ± 93.1 et de 832.9 ± 318.5 ($p < 0.05$ pour LTB₄ versus normal) pour les patients OA 1, de 1809.4 ± 116.8 et de 33.83 ± 19.57 ($p < 0.01$ pour PGE₂ ou LTB₄ versus normal) pour les patients OA 2 (figure 20). Ainsi, les Obs OA qui possédaient des niveaux similaires de PGE₂ et des niveaux élevés de LTB₄ comparativement aux Obs normaux ont été catégorisés en la population de patients OA 1 (ou OA Low) et les Obs OA qui possédaient des niveaux plus élevés de PGE₂ et faibles de LTB₄ comparativement aux Obs normaux ont été catégorisés en la population de patients OA 2 (ou OA High). C'est donc à partir de cette caractérisation des populations de patients que la discrimination des patients OA a été effectuée pour les résultats subséquents.

Production et régulation de LTB₄

Il est reconnu que la production de leucotriènes est sous la dépendance de 1,25(OH)₂D₃ et / ou de TGF-β dans d'autres modèles cellulaires. Les Obs répondent aussi à ces deux effecteurs et puisque nous avons déjà démontré que TGF-β1 est élevé dans les Obs OA (Massicotte *et al.* 2002), nous avons étudié la régulation de la synthèse de LTB₄ par 1,25(OH)₂D₃ et TGF-β1. Des augmentations respectives de $36.15 \pm 24.1\%$ ($p < 0.05$), $54.25 \pm 21.3\%$ ($p < 0.01$) et $102 \pm 29.7\%$ ($p < 0.01$) ont été observées pour les stimulations suivantes : 1,25(OH)₂D₃, TGF-β1, 1,25(OH)₂D₃ + TGF-β1 (figure 21).

Expression et régulation de la 5-LO et de la FLAP

Comme la production de LTB_4 est sensible aux stimulations, nous avons analysé l'expression de l'enzyme responsable de la synthèse de LTB_4 , la 5-LO, et l'expression de sa protéine associée, la FLAP. Nous avons en premier lieu vérifié la spécificité des amorces 5-LO et FLAP qui seraient utilisées dans les expériences de PCR dans notre système cellulaire et une seule bande a été observée lors de la détection. Nous avons ensuite déterminé le nombre de cycles requis dans la réaction d'amplification en PCR semi-quantitatif pour demeurer dans la portion linéaire d'amplification de la 5-LO et de la FLAP et obtenir des résultats reproductibles. Nous avons déterminé que 35 cycles étaient requis pour la 5-LO et 37 cycles pour la FLAP (résultat non illustré). Nous avons ensuite utilisé cette approche pour déterminer le niveau d'expression *in vitro* de la 5-LO et de la FLAP. Le niveau d'expression basal de la 5-LO était similaire entre les deux populations d'Obs OA et les Obs normaux (résultat non illustré), ainsi que son expression suite à la stimulation des cellules par le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, le TGF- β 1 ou la combinaison des deux (figure 22). Par contre, le niveau d'expression basale de la FLAP était variable. Celle-ci variait de 0.7533 ± 0.1354 dans les Obs OA 1 à 0.5563 ± 0.0056 dans les Obs OA 2 alors qu'elle était de 0.5820 ± 0.1089 dans les Obs normaux évaluée par RT-PCR semi-quantitatif (voir figure 23). Ces niveaux d'expression différents de la FLAP dans les deux populations d'Obs OA démontrent une relation directe mais inverse avec les niveaux de production de PGE_2 : lorsque PGE_2 était élevé, l'expression de FLAP était similaire aux Obs normaux alors que lorsque les niveaux de PGE_2 étaient faibles, l'expression de la FLAP était élevée.

Comme présenté dans la figure 23, la régulation de l'expression de la FLAP était perturbée dans les Obs OA en comparaison aux Obs normaux : la population OA 1 (ou Low) ne répond bien qu'à la combinaison $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + TGF- β 1 (avec une augmentation moyenne de $78.9\% \pm 0.4\%$ par rapport à leur niveau basal) ($p < 0.01$), alors que l'autre population de patients (OA 2 ou High) répondait bien à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (avec une augmentation moyenne de $117.5\% \pm 67.9\%$ par rapport à leur niveau basal) ($p <$

0.01) et à la combinaison de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + TGF- β 1 (avec une augmentation moyenne de $146.9\% \pm 18.1\%$ par rapport à leur niveau basal) ($p < 0.01$). Les Obs normaux, quant à eux, répondaient bien à toutes les stimulations (avec des augmentations moyennes de $88.9\% \pm 1.4\%$ pour la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $87.8\% \pm 0.5\%$ pour le TGF- β 1 et $147.4\% \pm 0.2\%$ pour la combinaison $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + TGF- β 1) ($p < 0.01$). Ainsi, les Obs OA des deux populations présentaient une réponse atténuée de la FLAP face à la stimulation par le TGF- β 1 (avec de faibles augmentations moyennes de $16.8\% \pm 0.2\%$ pour OA 1 et de $41.8\% \pm 1.8\%$ pour OA 2 par rapport à leur niveau basal).

Puisque les derniers résultats ont révélé que le TGF- β 1 stimulait faiblement l'expression de la FLAP dans les Obs OA des deux populations et que des travaux précédents ont démontré que les Obs OA produisent tous des niveaux élevés de TGF- β 1 sans égard à leur production de PGE_2 (Mansell et Bailey, 1998; Massicotte *et al.* 2002), nous avons évalué la régulation de l'expression de la FLAP en réponse à un anticorps neutralisant au TGF- β 1. Malheureusement, aucun aspect différentiel n'a été décelé entre les Obs OA et N (résultat non illustré). Sachant que la protéine active du TGF- β 1 est une protéine relâchée agissant sur les cellules cibles (cellules immunitaires, Obs, chondrocytes, etc.), l'évaluation de l'expression de la FLAP en réponse à un anticorps neutralisant de la liaison au récepteur de TGF- β 1 dans les Obs OA a été entreprise. Comme démontré dans les résultats de PCR en temps réel dans la figure 25, l'expression de la FLAP a diminué de $14.5\% \pm 10.6\%$ dans les Obs OA en réponse à ce traitement, toutefois elle a augmenté de $94.5\% \pm 67.1\%$ dans les Obs normaux.

La régulation de l'expression de la FLAP par le PGE_2 et par un inhibiteur sélectif de sa synthèse, le NS-398, a ensuite été évalué pour analyser la communication possible entre les deux voies de synthèse, de LTB_4 et de PGE_2 (voir figure 24 et 25). La réponse de la FLAP au PGE_2 était diminué de $68.6\% \pm 26.6\%$ dans les Obs OA ($p < 0.015$) et de $9.1\% \pm 0.9\%$ dans les Obs normaux. La réponse de la FLAP au NS-398 était augmenté

de $247.6\% \pm 143.3\%$ dans les Obs OA ($p < 0.03$), par contre cet effet est faible dans les Obs normaux ($39.8\% \pm 27.7\%$, non-significatif).

Niveaux de synthèse de la protéine FLAP

Les niveaux de synthèse de la protéine FLAP dans les mêmes conditions stimulantes ou non que l'étude des niveaux d'expression de la FLAP (décrits un peu plus haut) ont été tentés à plusieurs reprises, mais n'ont pu être déterminés. La technique d'immunobuvardage mise au point pour détecter la FLAP dans les extraits nucléaires des Obs OA et normaux et/ou dans les Obs OA et normaux est la même que celle déjà utilisée par notre laboratoire, mais dans le cas présent, les résultats étaient peu fiables. Le patron de détection démontrait avec les extraits d'Obs primaires une bande majeure à environ 80 kDa qui ne variait pas en fonction des traitements et qui ne correspondait pas à la FLAP. Parmi ces nombreux essais, la bande d'environ 18 kDa recherchée n'a été observée qu'une seule fois, ce qui ne permet une analyse rigoureuse de cette protéine.

Relation entre les niveaux de production de PGE₂ et d'IL-10 ou de PGE₂ et d'IL-18

Suite à la démonstration d'un lien possible entre les voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄ dans un système de cellules dendritiques par le biais de l'interleukine-10 (ou IL-10) dans l'étude d'Harizi *et al.* (2003), nous avons évalué si une corrélation existait entre le niveau de production de cet interleukine et les niveaux de PGE₂ et de LTB₄ dans notre système cellulaire. Les résultats de niveaux d'IL-10 relâchés dans le milieu étaient très faibles et stables pour les deux populations de patients et pour les individus normaux (résultat non illustré). Nous avons également vérifié s'il existait une relation directe entre l'induction d'une autre interleukine, l'IL-18, et la production significative de LTB₄ dans notre système cellulaire, comme dans le cas des neutrophiles de sang humain périphérique dans des modèles d'arthrite induite (Canetti *et al.* 2003). Tel qu'illustré dans la figure 26, les Obs OA relâchaient légèrement plus d'IL-18 que les Obs normaux. Plus précisément, les valeurs obtenues pour les deux populations d'Obs OA et les Obs

normaux sont de : 67.8 ± 19.4 pour la population de OA 1, 172.5 ± 61.4 pour la population OA 2 ($p < 0.01$) et 55.5 ± 15.4 pour les individus normaux. Si on compare ces valeurs aux valeurs obtenues de PGE_2 des deux populations d'Obs OA et les Obs normaux, la population de patients qui produisent des niveaux plus élevés de PGE_2 (OA 2) relâche également plus d'IL-18, bien que le niveau de production d'IL-18 est environ 12 fois plus faible que celui de PGE_2 .

LÉGENDES DES FIGURES

Figure 19: Relâche d'ostéocalcine et activité enzymatique de l'ALPase des ostéoblastes sous-chondraux humains stimulés par $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ provenant de patients OA et d'individus normaux. Des Obs OA et normaux humains ont été mis en culture dans du milieu BGJ contenant 20% de sérum de SVF jusqu'à l'atteinte de leur confluence. Après un passage, ils ont été incubés dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 10% de SVF jusqu'à l'atteinte de leur confluence de nouveau. Les cellules ont été stimulées avec un traitement au $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (50 nM) dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 2% de SVF charcoal pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon ALPase et récupérées par la suite pour fins d'analyse. L'évaluation de l'activité enzymatique de l'ALPase a été réalisée en mesurant l'hydrolyse de son substrat, la pNPP incolore en pNP coloré en jaune (par une incubation de 30 minutes) et détectée par spectrophotométrie à 405 nm. La relâche d'ostéocalcine a été mesurée dans les surnageants par un dosage EIA spécifique. La représentation graphique présente des résultats exprimés en moyenne \pm SEM de 18 patients OA et de 5 individus normaux.

Figure 20: Niveaux de production endogènes de PGE_2 et de LTB_4 dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE_2 faible et de LTB_4 élevé), OA 2 (niveau de PGE_2 élevé et de LTB_4 faible) et d'individus normaux. Des Obs OA humains ont été mis en culture dans du milieu BGJ contenant 20% de sérum de SVF jusqu'à l'atteinte de leur confluence. Après un passage, ils ont été incubés dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 10% de SVF jusqu'à l'atteinte de leur confluence de nouveau. Les cellules ont ensuite été incubées dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 0.5% de SVF pendant 48 heures (comme milieu contrôle). Les surnageants cellulaires ont été récupérés par la suite pour fins d'analyse. La quantification de la production de PGE_2 et de LTB_4 a été effectuée par un dosage EIA (voir section matériel et méthodes). Les représentations graphiques présentent des résultats exprimés en moyenne \pm SEM de 15 patients OA (8 OA1 et 7 OA 2) et de 11 individus normaux.

Figure 21: Régulation du niveau de production de LTB₄ dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA. Des Obs OA humains ont été mis en culture dans du milieu BGJ contenant 20% de sérum de SVF jusqu'à l'atteinte de leur confluence. Après un passage, ils ont été incubés dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 10% de SVF jusqu'à l'atteinte de leur confluence de nouveau. Les cellules ont ensuite été stimulées ou non avec un traitement au 1,25(OH)₂D₃ (50 nM) ou au 10 ng/mL de TGF-β1 ou à la combinaison des deux facteurs dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 0.5% de SVF pendant 48 heures. Les surnageants cellulaires ont été récupérés par la suite pour fins d'analyse. La quantification de la production de LTB₄ a été effectuée par un dosage EIA spécifique (voir section matériel et méthodes). La représentation graphique présente des résultats exprimés en moyenne ± SEM de 4 patients OA.

Figure 22: Régulation du niveau d'expression de la 5-LO par des ostéoblastes sous-chondraux humains d'un patient OA. À leur confluence, des Obs humains OA ont été stimulés pendant 48 heures avec l'un des traitements suivants dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 0.5% de SVF charcoale pendant 48 heures: contrôle, 1,25(OH)₂D₃, TGF-β1, 1,25(OH)₂D₃ + TGF-β1. Une quantité de 20 nM d'ionomycine a été ajoutée 24 heures avant la récolte des cellules. L'extraction d'ARN a été effectuée par une lyse au TRIzol. L'évaluation du niveau d'expression de la 5-LO a été réalisée par RT-PCR semi-quantitatif (35 cycles) avec une quantité de 2 µg d'ARN par puits avec une amorce spécifique de la 5-LO. La GAPDH a été utilisée comme gène « housekeeping » de référence (avec 20 cycles). Les ADNc amplifiés sont ensuite séparés sur un gel d'agarose 1.2% par électrophorèse d'une durée de 1 heure à 100 Volts. Les résultats sont donc exprimés par une représentation schématique du gel d'agarose 1.2 % d'un patient OA.

Figure 23: Régulation du niveau d'expression moyen de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE₂ faible et de LTB₄ élevé), OA 2 (niveau de PGE₂ élevé et de LTB₄ faible) et d'individus normaux. À leur confluence, des Obs humains OA et normaux ont été stimulés pendant 48 heures avec l'un des traitements suivants dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 0.5% de SVF charcoal pendant 48 heures: contrôle, 1,25(OH)₂D₃, TGF-β1, 1,25(OH)₂D₃ + TGF-β1. Une quantité de 20 nM d'ionomycine a été ajoutée 24 heures avant la récolte des cellules. L'extraction d'ARN a été effectuée par une lyse au TRIzol. L'évaluation du niveau d'expression de la FLAP a été réalisée par RT-PCR semi-quantitatif (37 cycles) avec une quantité de 2 µg d'ARN par puits avec une amorce spécifique de la FLAP. La GAPDH a été utilisée comme gène « housekeeping » de référence (avec 20 cycles). Les ADNc amplifiés sont ensuite séparés sur un gel d'agarose 1.2% par électrophorèse d'une durée de 1 heure à 100 Volts et les bandes sont analysées par densitométrie. Les résultats sont donc exprimés par une représentation schématique du gel d'agarose 1.2 % d'un patient OA 1, d'un patient OA 2 et d'un individu normal, ainsi que par un tableau compilant les résultats de l'analyse densitométrique exprimés en moyenne ± SEM de 6 patients OA (3 OA 1 et 3 OA 2) et de 3 individus normaux.

Figure 24: Régulation du niveau d'expression de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains d'un patient OA et d'un individu normal. À leur confluence, des Obs humains OA et normaux ont été stimulés pendant 48 heures avec l'un des traitements suivants dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 0.5% de SVF charcoal pendant 48 heures: contrôle, Anti-récepteur au TGF-β, PGE₂, NS-398. Une quantité de 20 nM d'ionomycine a été ajoutée 24 heures avant la récolte des cellules. L'extraction d'ARN a été effectuée par une lyse au TRIzol. L'évaluation du niveau d'expression de la FLAP a été réalisée par RT-PCR semi-quantitatif (37 cycles) avec une quantité de 2 µg d'ARN par puits avec une amorce spécifique de la FLAP. La GAPDH a été utilisée comme gène « housekeeping » de référence (avec 20 cycles). Les ADNc amplifiés sont ensuite séparés sur un gel d'agarose 1.2% par électrophorèse d'une durée

de 1 heure à 100 Volts. Les résultats sont donc exprimés par une représentation schématique du gel d'agarose 1.2 % d'un patient OA et d'un individu normal.

Figure 25: PCR en temps réel démontrant la régulation du niveau d'expression moyen de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA et d'individus normaux. À leur confluence, des Obs humains OA et normaux ont été stimulés pendant 48 heures avec l'un des traitements suivants dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 0.5% de SVF charcoal pendant 48 heures: contrôle, Anti-récepteur au TGF- β , PGE₂, NS-398. Une quantité de 20 nM d'ionomycine a été ajoutée 24 heures avant la récolte des cellules. L'extraction d'ARN a été effectuée par une lyse au TRIzol. L'évaluation du niveau d'expression de la FLAP a été réalisée par RT-PCR quantitatif avec une quantité de 100 ng d'ARN par puits avec une amorce spécifique de la FLAP. La GAPDH a été utilisée comme gène « housekeeping » de référence. La représentation graphique présente des résultats exprimés en moyenne \pm SEM de 7 patients OA et 3 individus normaux.

Figure 26: Niveaux de production endogènes de PGE₂ et d'IL-18 dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE₂ faible et de LTB₄ élevé), OA 2 (niveau de PGE₂ élevé et de LTB₄ faible) et d'individus normaux. Des Obs OA humains ont été mis en culture dans du milieu BGJ contenant 20% de sérum de SVF jusqu'à l'atteinte de leur confluence. Après un passage, ils ont été incubés dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 10% de SVF jusqu'à l'atteinte de leur confluence de nouveau. Les cellules ont ensuite été incubées dans du milieu HAM F12/DMEM contenant 0.5% de SVF pendant 48 heures (comme milieu contrôle). Les surnageants cellulaires ont été récupérés par la suite pour fins d'analyse. La quantification de la production de PGE₂ et d'IL-18 a été effectuée respectivement par un dosage EIA et ELISA spécifique (voir section matériel et méthodes). Les représentations graphiques présentent des résultats exprimés en moyenne \pm SEM de 15 patients OA (8 OA1 et 7 OA 2) et de 11 individus normaux.

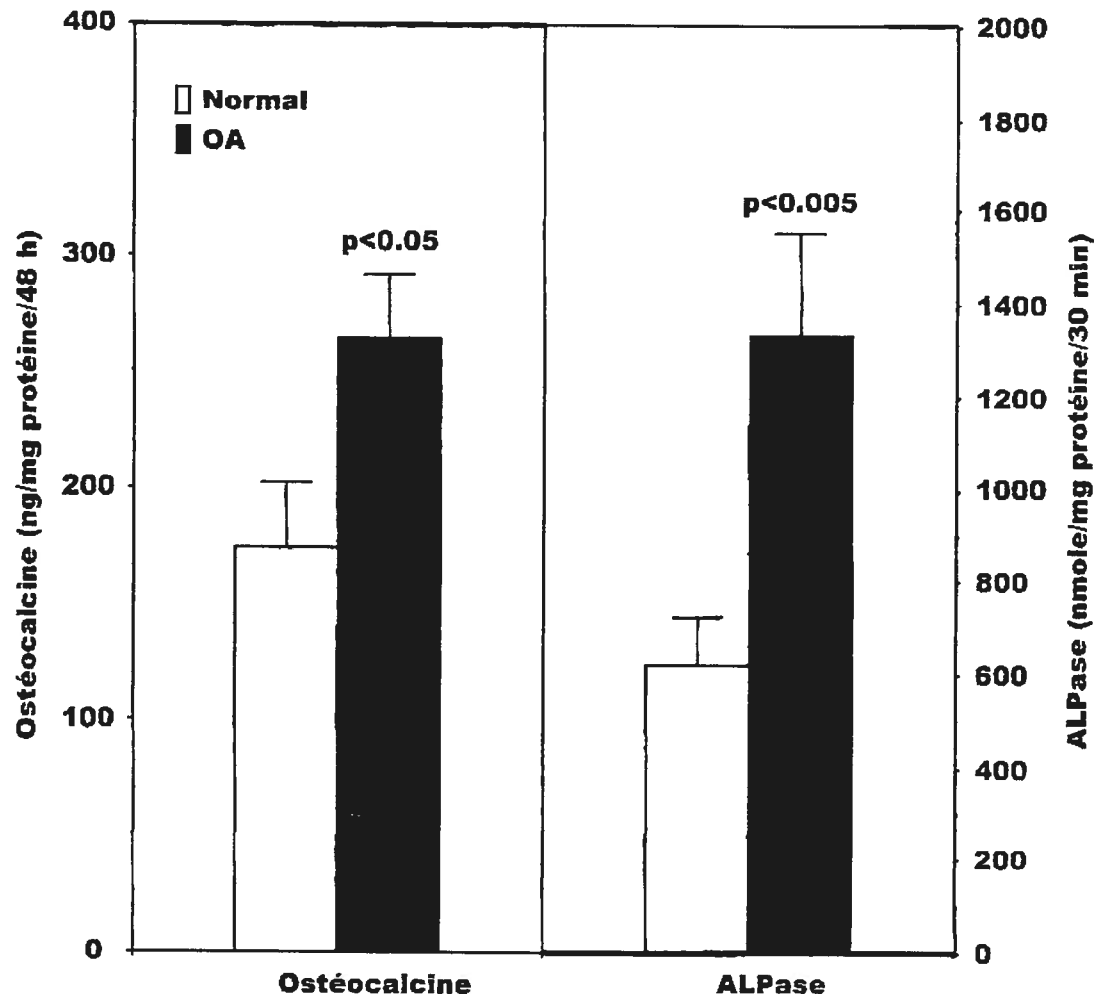


Figure 19: Relâche d'ostéocalcine et activité enzymatique de l'ALPase des ostéoblastes sous-chondraux humains stimulés par $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ provenant de patients OA et d'individus normaux.

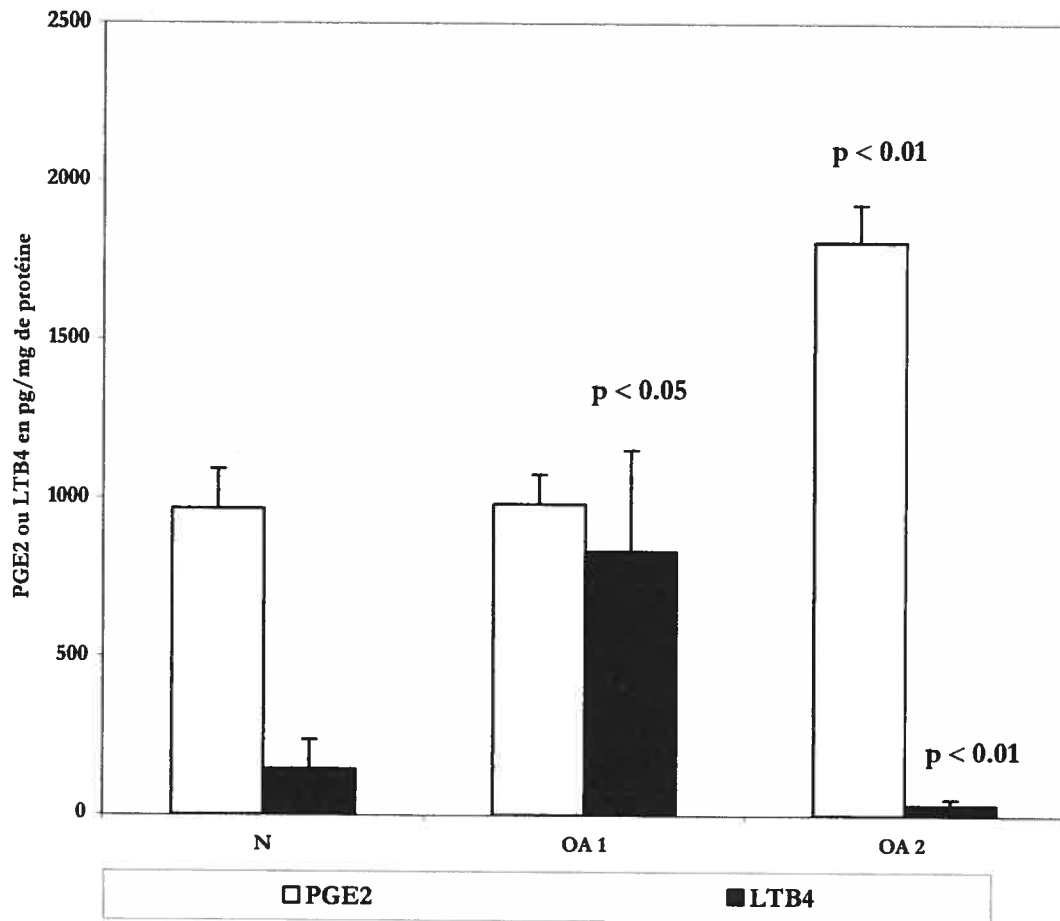


Figure 20 : Niveaux de production endogènes de PGE₂ et de LTB₄ dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE₂ faible et de LTB₄ élevé), OA 2 (niveau de PGE₂ élevé et de LTB₄ faible) et d'individus normaux.

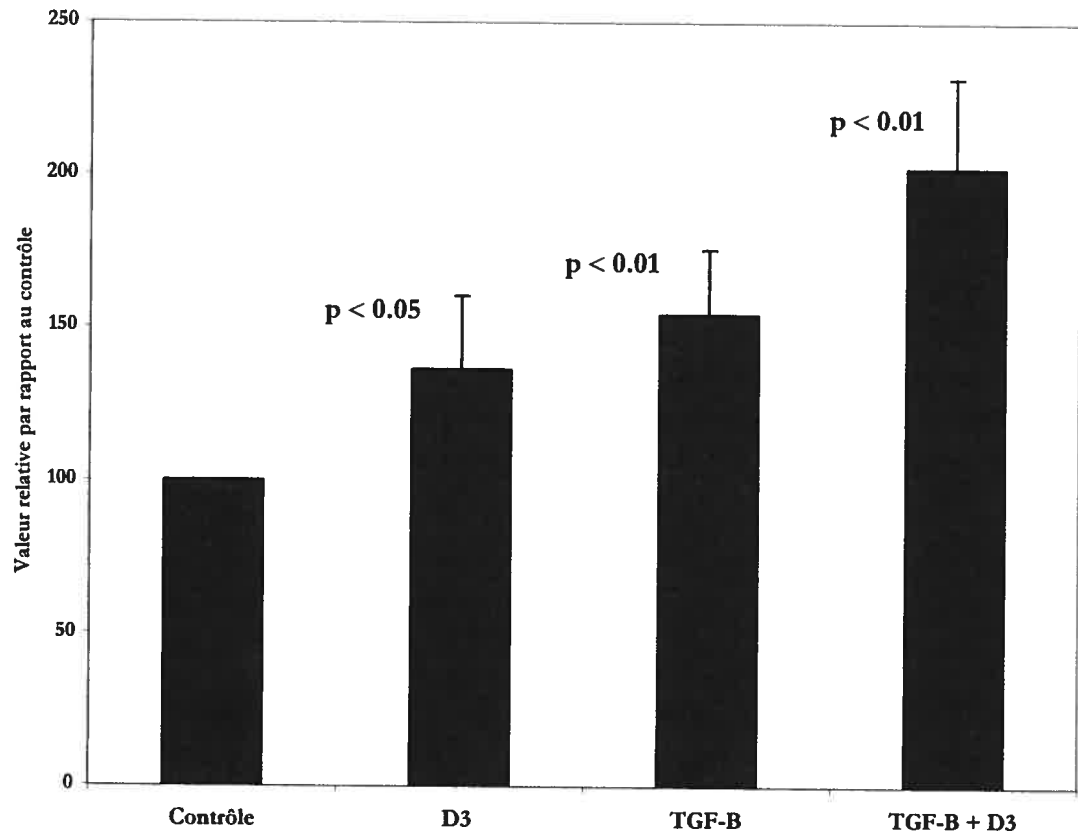


Figure 21: Régulation du niveau de production de LTB_4 dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA.

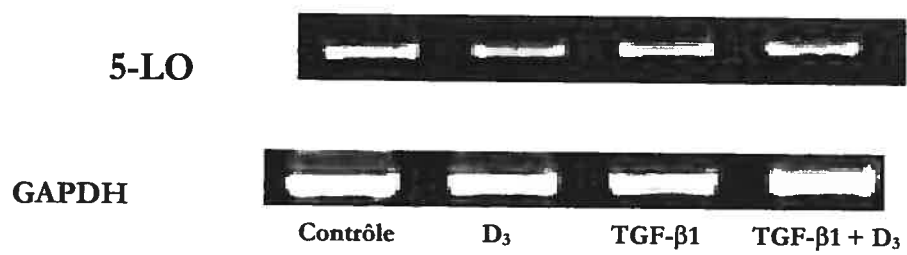
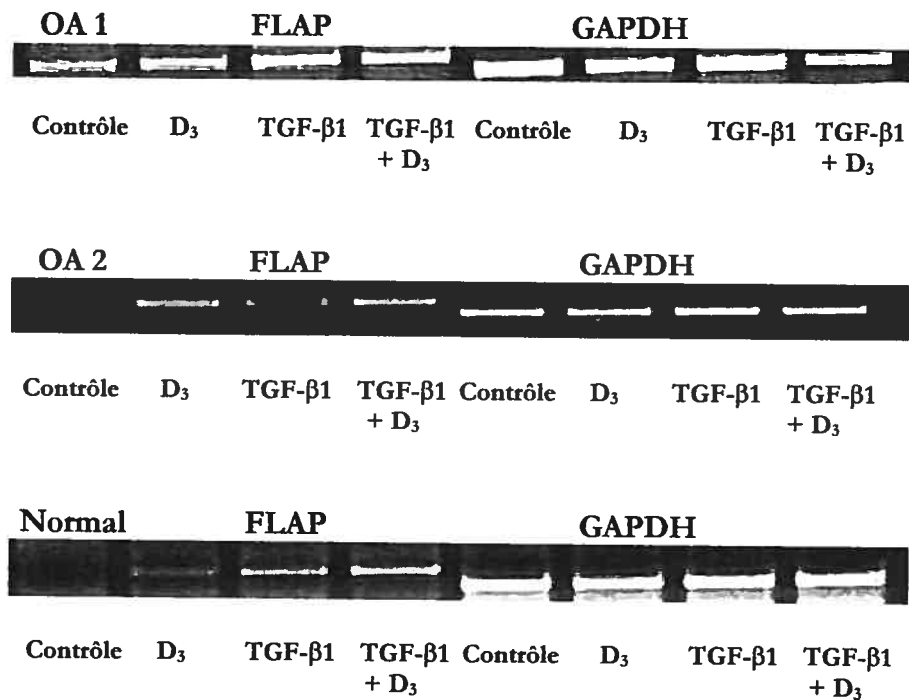


Figure 22: Régulation du niveau d'expression de la 5-LO par des ostéoblastes sous-chondraux humains d'un patient OA.



	Contrôle	D ₃	TGF-β1	D ₃ + TGF-β1	ANOVA
Normal	0.5820 ± 0.1089	1.0995 * ± 0.2566	1.0928 * ± 0.1607	1.4400 * ± 0.1329	0.004
OA1 (LOW)	0.7533 ± 0.1354	1.0233 ± 0.1584	0.8795 ± 0.1124	1.3473 * ± 0.1948	0.025
OA 2 (HIGH)	0.5563 ± 0.0056	1.2100 * ± 0.3860	0.7887 ± 0.0154	1.3733 * ± 0.1072	0.010

* statistiquement significative (p < 0.01)

Figure 23: Régulation du niveau d'expression moyen de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE₂ faible), de patients OA 2 (niveau de PGE₂ élevé) et d'individus normaux.

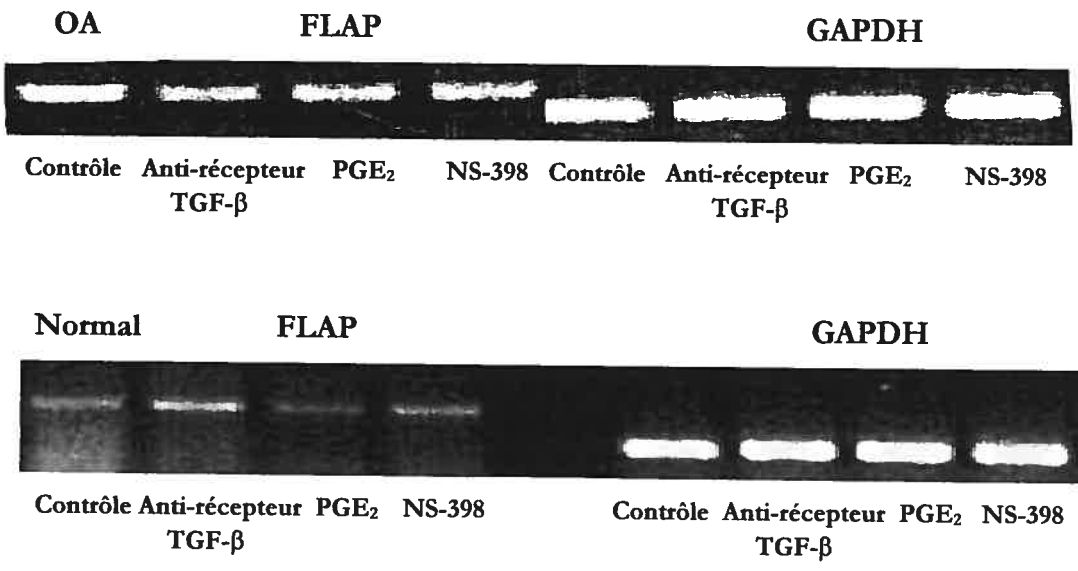


Figure 24: Régulation du niveau d'expression de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains d'un patient OA et d'un individu normal.

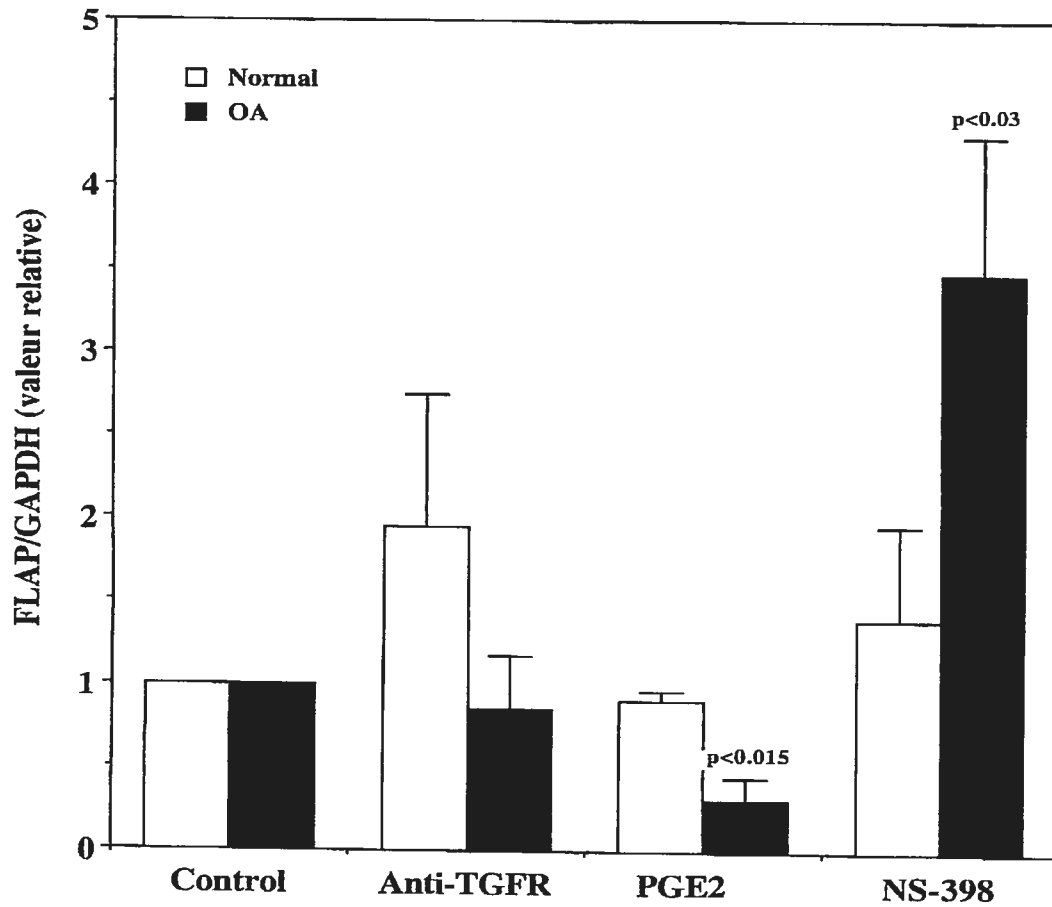


Figure 25: PCR en temps réel démontrant la régulation du niveau d'expression moyen de la FLAP dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA et d'individus normaux.

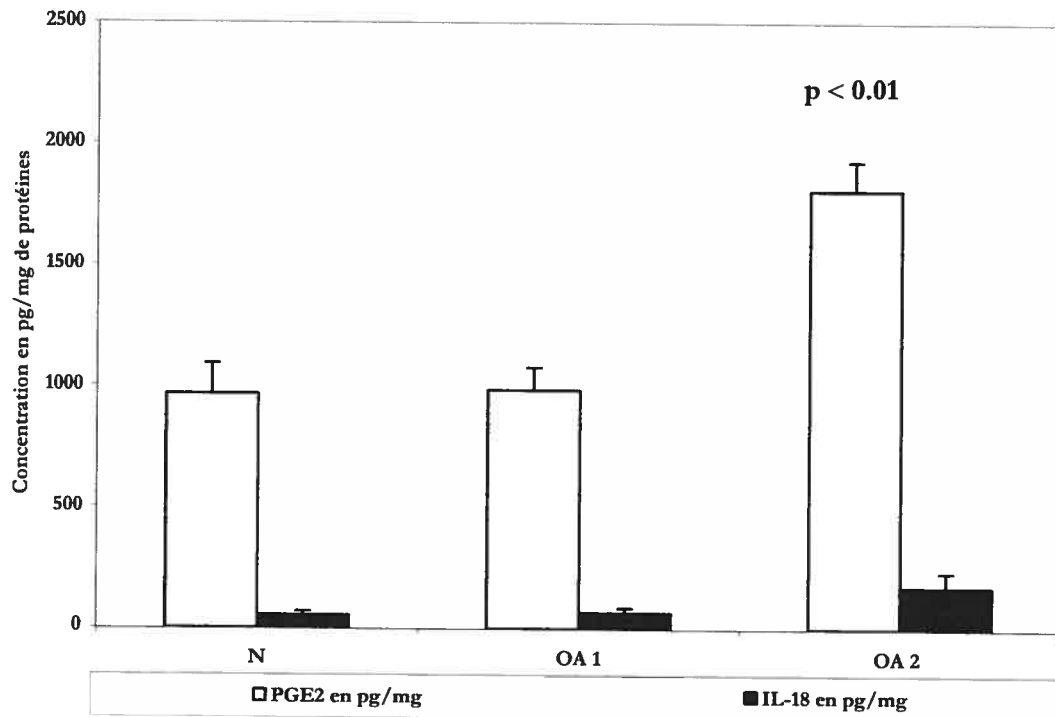
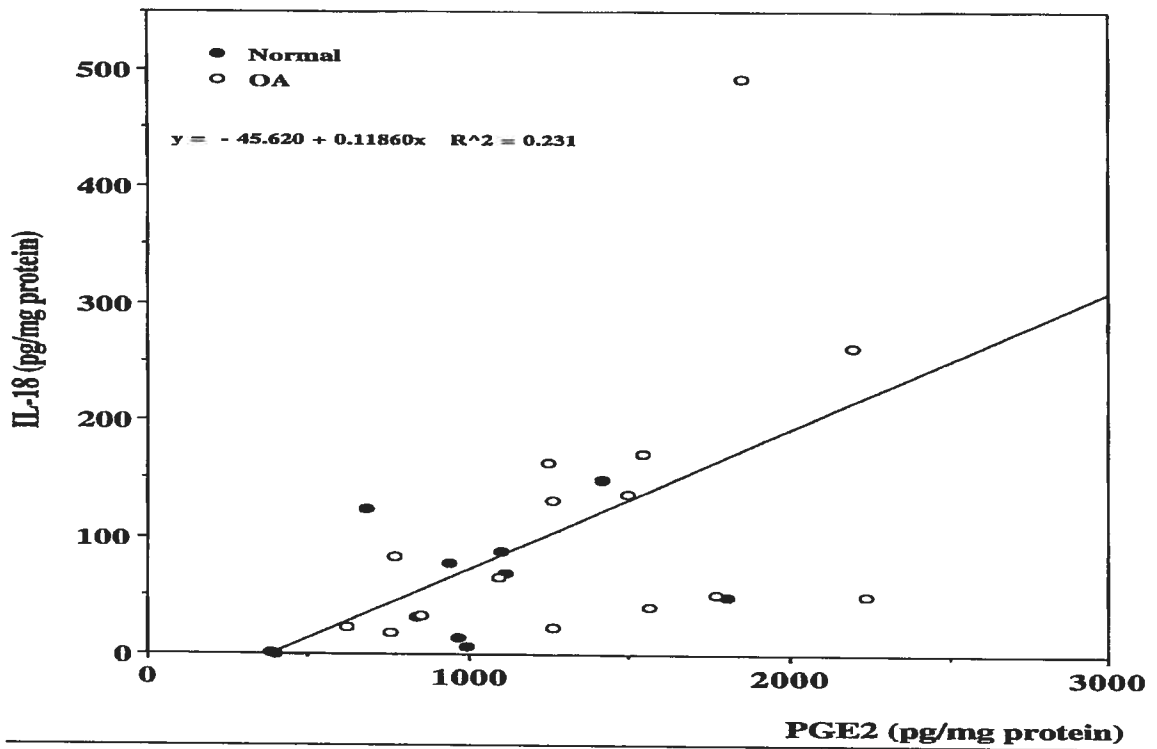


Figure 26: Niveaux de production endogènes de PGE₂ et d'IL-18 dans des ostéoblastes sous-chondraux humains de patients OA 1 (niveau de PGE₂ faible et de LTB₄ élevé), OA 2 (niveau de PGE₂ élevé et de LTB₄ faible) et d'individus normaux.

DISCUSSION

L'arthrose est la maladie dégénérative des articulations la plus diagnostiquée au monde et la principale cause d'invalidité de longue durée au Canada (La Société d'arthrite du Canada, *Arthroscope* 2003). Sa pathogenèse est multifactorielle et complexe. De plus, son étiologie et sa progression sont encore mal comprises à ce jour. Elle constitue donc un problème médical majeur de la société et mérite une attention particulière.

Comme les caractéristiques dégénérescentes étaient plus perceptibles dans le cartilage articulaire, les structures associées ont longtemps été considérées comme des conséquences secondaires de cette dégradation du cartilage. Cette dernière hypothèse a été remise en doute après la révélation de travaux de chercheurs comme Radin *et al.* (1970), Dieppe *et al.* (1993), Carlson *et al.* (1994), Billingham *et al.* (1996), Westacott *et al.* (1997), etc. qui ont indiqué que les changements dégénérescents du cartilage seraient précédés par ceux de l'os sous-chondral. Ainsi, l'arthrose pourrait débiter comme une maladie «osseuse» qui entraîne des désordres dans les articulations. Depuis, l'os a été reconnu comme étant, de façon incontestable, intimement impliqué dans l'initiation et la progression de l'OA (Burr, 2004). Bien que les mécanismes impliqués entre l'interaction os-cartilage demeurent inconnus à ce jour, les vaisseaux sanguins de l'os sous-chondral qui approvisionnent le cartilage en nutriments (Hogue et Mersfelder, 2002) et la possibilité de canaux de liaison entre l'os sous-chondral et le cartilage qui favoriseraient le transfert de facteurs de croissance, cytokines ou enzymes de l'os sous-chondral vers le cartilage (Burr, 1998; Martel-Pelletier et Pelletier, 2003; Lajeunesse et Reboul, 2003) confèrent à la composante osseuse une importance considérable. Si une perturbation de son métabolisme survenait, toutes ces dernières fonctions seraient affectées.

Par sa sclérose et la formation d'ostéophytes, l'os sous-chondral représente l'élément structural le plus important dans l'apparition de douleur (Dieppe, 1999) et comme l'inflammation et la douleur sont à l'origine de la perte de mobilité des cas d'invalidité due à l'arthrite, notre choix s'est donc arrêté sur ce composant morphologique pour l'étude de la réponse inflammatoire de l'OA. Les mécanismes

responsables de la sclérose osseuse sont toujours mal compris et les études chez l'homme n'ont pas encore permis de discriminer entre une perturbation généralisée du métabolisme ou une perturbation généralisée cellulaire. Par contre, les recherches réalisées par notre laboratoire ont révélé que les Obs OA ont un fonctionnement altéré. Conséquemment, le métabolisme osseux serait perturbé et engendrerait la sclérose osseuse observée chez les personnes atteintes. Ainsi, pour améliorer la qualité de vie de ces personnes atteintes, il faut pouvoir comprendre les mécanismes de la réponse inflammatoire de l'OA chez ces patients. La plupart des médicaments anti-inflammatoires approuvés par la FDA pour gérer l'OA agissent sur les enzymes COX (COX-1 et/ou COX-2) pour inhiber la production de PGs à partir de l'A.A. Cependant, comme la section 4.1.1.3 le décrit, plusieurs études ont prouvé qu'une inhibition à long terme de la production de PGs pouvait engendrer un «court-circuit» de cette voie et l'activation de la voie des enzymes 5-lipoxygénases pour transformer alternativement l'A.A. en LTs. Ces derniers sont des puissants amplificateurs de la réponse inflammatoire. Ainsi, l'approche clinique actuelle, à court terme, est bénéfique mais représente-t-elle une solution viable à long terme ?

Antérieurement, notre laboratoire a démontré que les Obs OA produisent des niveaux variables de PGE_2 et de LTB_4 et qu'une relation inverse existait entre ces niveaux de production. De plus, un «court-circuit» vers la voie de production de LTB_4 lors d'une inhibition à long terme de la voie de production de PGs semble se produire dans les Obs OA par un inhibiteur spécifique de la COX-2 (NS-398). Ces voies de synthèse semblaient donc communiquer entre elles dans les Obs OA, mais les mécanismes mis en place demeuraient inconnus. Ainsi, l'hypothèse de travail était de déterminer ce qui régule ce «cross-talk» entre les voies de synthèse de prostaglandines (PGE_2) et de leucotriènes (LTB_4) dans les Obs de l'os sous-chondral humain chez des patients OA.

Phénotype des ostéoblastes sous-chondraux humains

L'activité des Obs peut être reflétée par l'activité de l'ALPase et par la relâche d'ostéocalcine en conditions stimulantes (par $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) comme décrit dans les travaux effectués par Lajeunesse *et al.* (1991) et Lajeunesse *et al.* (1996). Cette différence entre les Obs normaux et OA est toujours observée *in vitro* (Hilal *et al.* 1998; Massicotte *et al.* 2002) et reflète une situation déjà observée *in vivo* dans le tissu osseux OA (Lajeunesse *et al.* 2004). Mes travaux ont indiqué que l'activité enzymatique moyenne de l'ALPase des Obs sous-chondraux humains OA était 2 fois plus élevée que celle des Obs normaux, alors que la relâche moyenne d'ostéocalcine était d'environ 1.5 fois plus élevée que celle des Obs normaux. Ainsi, comme l'ALPase et l'ostéocalcine sont des marqueurs spécifiques du phénotype des Obs, les cultures primaires d'Obs que j'ai effectuées représentaient bien des ostéoblastes matures et fonctionnels.

Production et régulation de LTB_4

Afin d'étudier la régulation de la production de LTB_4 , la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et le $\text{TGF-}\beta 1$ ont été choisis. Ces deux facteurs ont été sélectionnés car leurs effets régulateurs sur l'activité enzymatique de la synthèse de LTB_4 sont bien connus dans plusieurs systèmes cellulaires, tels que les cellules de lignée leucémique humaine HL60 (Bennett *et al.* 1993) et les cellules de la lignée monocyttaire Mono Mac 6 (Härle *et al.* 1998). En effet, une augmentation prononcée de l'activité enzymatique de la 5-LO se produisait lorsque les cellules HL60 avaient été traitées par le $\text{TGF-}\beta$. Cette réponse du $\text{TGF-}\beta$ était d'autant plus efficace en présence de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Un effet similaire a aussi été observé dans le modèle cellulaire Mono Mac 6. Mes recherches sur l'étude de la régulation de la production de LTB_4 ont permis de constater que les Obs OA répondent de façon similaire aux Obs normaux en réponse aux facteurs suivants : $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, au $\text{TGF-}\beta 1$ et à la combinaison de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 + \text{TGF-}\beta 1$. Ces traitements ont augmenté de façon significative la production de LTB_4 de 36 à 102% chez la moyenne des patients OA de l'étude. Bien que la réponse basale individuelle soit faible comparativement à celle des

macrophages, la production de LTB_4 par les Obs OA, en réponse à la $1,25(OH)_2D_3$, au TGF- β 1 et à la combinaison de $1,25(OH)_2D_3$ + TGF- β 1 correspond à ce qui était décrit dans la littérature pour les macrophages (Werz *et al.* 2000). Par conséquent, si la régulation de la production de LTB_4 par les Obs OA n'est pas perturbée, elle ne peut expliquer les niveaux de productions variables de LTB_4 antérieurement obtenus avec les Obs OA (Paredes *et al.* 2002). Toutefois, la réponse de ces facteurs sur la production de PGE_2 aurait potentiellement pu nous indiquer si ce dernier aurait un rôle à jouer dans le « cross-talk ».

Expression et régulation de la 5-LO et de la FLAP

Mes travaux effectués avec l'ARNm des Obs de l'os sous-chondral par RT-PCR ont révélé que l'expression de l'enzyme responsable de la synthèse des LTs, la 5-LO, n'était pas perturbée chez les patients OA. De plus, l'expression de la 5-LO n'a pas été modifiée par la $1,25(OH)_2D_3$, le TGF- β 1 et la combinaison de $1,25(OH)_2D_3$ + TGF- β 1. Par conséquent, nos résultats avec la 5-LO démontre que les variations observées de la synthèse de LTB_4 par les Obs OA ne peuvent être attribuées à une régulation de l'expression de la 5-LO. Toutefois, dans les cellules HL60, une induction 6 fois plus élevée que le niveau basal a été obtenue en réponse à la $1,25(OH)_2D_3$ (Bennett *et al.* 1993). Cependant, une étude réalisée par Coffey *et al.* (1994) avec les macrophages alvéolaires et péritonéales différenciés d'un modèle de rat déficient en $1,25(OH)_2D_3$ a démontré que l'incubation avec 50 nM de $1,25(OH)_2D_3$ exogène a permis le rétablissement de la capacité biosynthétique de LTB_4 avec une augmentation correspondante de l'expression de la FLAP sans modification de l'expression de la 5-LO. La situation des Obs humains ressemble donc mieux à celle des macrophages alvéolaires. Néanmoins, comme notre laboratoire l'avait antérieurement démontré, il existait des niveaux variables (faibles ou élevés) de LTB_4 produits par les patients OA (Paredes *et al.* 2002), il devait donc y avoir un facteur responsable de ces variations de production. Il fallait donc observer le niveau de synthèse et l'activité enzymatique de la 5-LO dans les mêmes conditions afin de confirmer qu'il n'est pas responsable des variations de production de LTB_4 ou analyser

l'effet de sa protéine associée, la FLAP. Nous savons que l'association membranaire productive de la 5-LO nécessaire pour engendrer la synthèse de LTs est régulée par la FLAP (Vickers, 1995). On a alors analysé l'expression de la FLAP.

Tout d'abord, on a observé un niveau d'expression basale moyen plus élevé chez les patients OA 1 et plus ou moins similaire chez les patients OA 2 comparativement aux individus normaux. De plus, les niveaux d'expression différents de la FLAP obtenus dans les deux populations d'Obs OA démontraient une relation directe mais inverse avec les niveaux de production de PGE₂ : lorsque PGE₂ était élevé, l'expression de FLAP était similaire aux Obs normaux alors que lorsque les niveaux de PGE₂ étaient faibles, l'expression de la FLAP était élevée tout comme les niveaux de PGE₂ et de LTB₄ dosés par EIA dans cette étude. Il a été mentionné précédemment que les modifications d'expression de la FLAP influencent énormément les capacités biosynthétiques cellulaires des LTs (Peters-Golden et Brock, 2003). De plus, plusieurs données de la littérature ont également démontré que l'expression de la FLAP est régulée par la 1,25(OH)₂D₃ (Coffey *et al.* 1994; Crooks et Stockley, 1998; Peters-Golden et Brock, 2003). Ainsi, les données du RT-PCR des niveaux de base de la FLAP chez les patients OA 1 et OA 2 de mes travaux corroborent avec les niveaux de LTB₄ déjà publiés (Paredes *et al.* 2002).

La régulation de la FLAP avec les mêmes effecteurs que la 5-LO a présenté une perturbation dans les Obs OA en comparaison du comportement des Obs normaux. Plus spécifiquement, la réponse des deux groupes de patients OA suggèrent une certaine résistance dans la réponse au TGF-β1 seul. D'autres données récentes avaient déjà indiqué que le niveau de TGF-β1 est plus élevé pour les Obs OA que les Obs normaux (Massicotte *et al.* 2002). Par conséquent, ces dernières données nous révèlent que les cellules OA semblent déjà être anormalement sur-stimulées au départ par le TGF-β1 endogène, il est alors possible que ces Obs OA ne puissent plus répondre à une stimulation subséquente. Cette constatation aurait pu être vérifiée en déterminant les

niveaux de synthèse de la protéine FLAP dans les mêmes conditions, situation qui a été impossible à vérifier compte tenu de la piètre qualité des outils disponibles.

Par ailleurs, l'évaluation de la régulation de l'expression de la FLAP par un anticorps neutralisant de la liaison au récepteur de TGF- β 1 dans les Obs OA a diminué de $14.5\% \pm 10.6\%$ l'expression de la FLAP. Cette faible diminution peut être due à une faible efficacité de cet anticorps dans la stimulation des Obs dans notre système de culture *in vitro* ou à une altération ou à une perte de la capacité de réponse générale du TGF- β 1 dans les Obs OA. Par ailleurs, puisque la réponse à cet anticorps fut d'augmenter l'expression de la FLAP de $94.5\% \pm 67.1\%$ dans les Obs normaux, il serait possible d'affirmer que l'anticorps semble inefficace pour inhiber la réponse endogène au TGF- β 1 produit par les Obs dans notre système de culture *in vitro*. Ainsi, à ce stade, il est seulement possible d'affirmer que la production de TGF- β 1 est exagérée dans les Obs OA et que le TGF- β exogène semble difficilement capable d'induire la FLAP. Ces dernières constatations suggèrent donc que la voie de signalisation de TGF- β est altérée chez les patients OA. Pour appuyer cette explication, la détermination des niveaux de synthèse de la protéine FLAP dans les mêmes conditions aurait été souhaitable. Néanmoins, le peu d'effet du TGF- β 1 sur les Obs OA ne répond pas à la question de la différence de niveau d'expression de FLAP des deux populations d'OA à l'état basal. Puisque le TGF- β 1 n'est pas la cause, nous devons donc conclure que les niveaux de PGE₂ sont beaucoup plus importants pour contrôler la FLAP.

Afin d'analyser l'existence d'un «court-circuit» vers la voie de production de LTB₄ lors d'une inhibition à long terme de la voie de production de PGE₂ et la possibilité de communication entre les deux voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄, l'analyse de la réponse de l'expression de la FLAP au PGE₂ et à un inhibiteur sélectif de COX-2 (une des deux isoformes synthétisant PGE₂), NS-398, a donc été réalisée. La forte diminution de l'expression de la FLAP par PGE₂ et l'augmentation exagérée de cette réponse par NS-398 (quantifiées par PCR en temps réel) dans les Obs OA ont permis de confirmer la relation directe mais inverse entre les niveaux de production de

PGE₂ et de LTB₄ dans les Obs OA. L'étude de Paredes *et al.* (2002) a antérieurement démontré *in vitro* un niveau 4 fois plus élevé de LTB₄ lorsque des ostéoblastes sous-chondraux humains avaient été traités de façon chronique par NS-398. Or, mes résultats de la réponse de la FLAP par NS-398 traité de façon aigue (quantifiés par PCR en temps réel) ont indiqué une augmentation de 2.5 fois son expression dans les Obs OA. Par conséquent, mes résultats corroborent ceux des travaux de Paredes *et al.* (2002). Par ailleurs, la comparaison des résultats de l'expression de la FLAP par PGE₂ et NS-398 des Obs OA avec ceux des Obs normaux suggèrent que les voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄ sont perturbées dans les Obs OA. D'ailleurs, une étude réalisée par O. Sahap Atik (1990) pour déterminer les niveaux d'activité de PGE₂ et de LTB₄ dans les fluides synoviaux de genou de 10 patients atteints de OA et 10 individus normaux a indiqué que les patients OA possèdent un niveau d'activité de PGE₂ 2.6 fois plus élevé et un niveau d'activité de LTB₄ 2.4 fois plus élevé que les individus normaux (bien que les patients OA possédaient 7 fois plus d'activité PGE₂ que d'activité LTB₄). En d'autres mots, il existe, au départ, une surproduction de ces médiateurs dans les fluides synoviaux de genoux des patients OA. Ces dernières données viennent renforcer la suggestion de voies de synthèses altérées dans les Obs OA.

Niveaux de synthèse de la protéine FLAP

Afin de vérifier la validité de la technique d'immunobuvardage mise au point pour détecter la FLAP dans les Obs et/ou dans les extraits nucléaires d'Obs, ainsi que la spécificité de l'anticorps primaire (antisérum polyclonal anti-FLAP IgG de lapin), des tests avaient préalablement été effectués avec des cellules d'ostéosarcomes MG-63 où toutes les conditions nécessaires à la détection de la protéine FLAP avaient été établies. Cependant, malgré de nombreuses modifications de cette dernière mise au point (plusieurs dilutions de l'anticorps primaire, plusieurs temps d'exposition pour la révélation, différents traitements cellulaires, etc.), la détection de cette protéine est demeurée sans succès. Voici quelques problématiques rencontrées: le seul anticorps disponible agissant contre la FLAP est celui de J. F. Evans de Merck Frosst Canada qui a été largement utilisé (Woods *et al.* 1993; Reid *et al.* 1990; Coffey *et al.* 1994; Brock *et al.*

1995, etc.), mais cet anticorps est en fait un antisérum polyclonal anti-FLAP IgG de lapin qui cause plusieurs interférences visibles lors de la détection des résultats (comme par exemple la présence de bandes IgG).

Relation entre les niveaux de production de PGE₂ et d'IL-10 ou de PGE₂ et d'IL-18

Bien qu'un lien direct est établi entre les voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄ chez les patients OA, il serait important de connaître le facteur responsable de la régulation de ce «cross-talk». La littérature a déjà présenté deux candidats potentiels : IL-10 ou IL-18 (Harizi *et al.* 2003; Canetti *et al.* 2003). Le premier candidat vient de l'étude d'Harizi *et al.* (2003) qui a suggéré un lien inverse entre PGE₂ et LTB₄ dans un système de cellules dendritiques. Selon cette étude, le PGE₂ augmenterait de façon dose-dépendante la production endogène de l'interleukine-10 (IL-10) dans des cellules dendritiques et l'IL-10 inhiberait ensuite l'expression et la production de la FLAP sans effet sur l'activité de la PLA₂ et sur les taux de production de la 5-LO. Ainsi, PGE₂ pourrait influencer le taux de production de LTB₄ en agissant sur l'expression et la production de la FLAP par l'intermédiaire de l'IL-10. Comme nous n'avons aucune donnée concernant ces niveaux dans les Obs OA, nous avons tenté de vérifier si les mêmes effets étaient manifestés dans notre système cellulaire. Cependant, malgré qu'ils soient stables et faibles, les résultats d'IL-10 n'ont pas démontré d'aspect différentiel entre les deux populations OA et les individus normaux.

Dans un même ordre d'idée, Canetti *et al.* (2003) ont indiqué qu'il existerait une relation directe entre l'induction d'une autre interleukine, l'IL-18, et la production de LTB₄ dans les neutrophiles de sang humain périphérique dans des modèles d'arthrite induite. Nous avons donc évalué l'effet de ce second candidat dans notre système cellulaire. Notre étude a permis de constater que les niveaux de production d'IL-18 variaient dans les Obs des deux populations OA et des individus normaux. Plus spécifiquement, les Obs OA relâchaient légèrement plus d'IL-18 que les Obs normaux. De plus, une corrélation fut observée entre la production de PGE₂ et celle de IL-18 (voir figure 26). Cependant, mes travaux avec les surnageants cellulaires d'Obs OA ont révélé

des concentrations moyennes respectives de 1396 ± 105 pg/mg et de 120.2 ± 40.4 pg/mg pour PGE₂ et IL-18, donc un niveau de production d'IL-18 environ 12 fois plus faible que celui de PGE₂. Ainsi, la corrélation obtenue dans mes recherches indique qu'une relation existe entre PGE₂ et IL-18. Les données de travaux récents de Futani *et al.* (2002) effectuée avec les fluides synoviaux de genou de 30 patients atteints de OA ont aussi révélé une corrélation linéaire entre les niveaux de production de PGE₂ et d'IL-18, bien que leurs niveaux de production d'IL-18 étaient 2.7 fois plus élevé que ceux de PGE₂. Des essais directs de stimulation de PGE₂ par IL-18 exogène ou vice versa et la détermination des niveaux d'expression et de synthèse de la FLAP devront être entrepris pour bonifier ce point et pour déterminer la séquence des événements. À ce stade, il n'est pas possible d'affirmer si cette corrélation représente une relation directe et/ou si elle peut expliquer la communication entre les voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄ chez les patients OA.

Mes recherches ont permis de démontrer que la régulation de la production de LTB₄ par 1,25(OH)₂D₃ et TGF-β1 est sensiblement normale, mais que le niveau d'expression et la régulation de l'expression d'une des enzymes responsable de sa synthèse, la FLAP, est perturbée chez ces patients comparativement à celle des individus normaux. Mes travaux ont également permis d'affirmer que les niveaux d'expression variables de la FLAP dans les deux populations d'Obs OA démontrent une relation directe mais inverse avec les niveaux de production de PGE₂ et que le «court-circuit» vers la voie de production de LTB₄ lors d'une inhibition à long terme de la voie de production de prostaglandines dans les Obs OA semble être régulé par l'expression de la FLAP (et non de la 5-LO). Cependant, l'absence de niveaux de synthèse de la protéine FLAP dans les mêmes conditions rend difficile la confirmation de cette affirmation. Ces deux populations d'Obs OA pourrait représenter deux différents stades de la pathologie au niveau inflammatoire. Sachant que le LTB₄ constitue une molécule amplificatrice de la réponse inflammatoire par son activité chémoattractante et que la combinaison du LTB₄ au PGE₂ provoque une réaction synergique amplifiant l'induction de l'œdème (Brain et Williams, 1990), la population de patient OA 1 serait vraisemblablement à un

stade plus avancé de la maladie d'OA que la population de patient OA 2. Comme PGE₂ et LTB₄ sont des médiateurs lipidiques jouant un rôle clé dans les actions de cellules pro-inflammatoires, si leurs voies de synthèses sont altérées, ça rend d'autant plus difficile la gestion de la douleur associée à la pathologie de l'OA et la rémission éventuelle des patients atteints. Des résultats obtenus avec la stimulation par le TGF- β et par l'anticorps de la liaison au récepteur du TGF- β semble indiquer que la voie de signalisation du TGF- β est aussi altérée chez les patients OA. Cette dernière découverte pourrait expliquer la croissance exagérée du tissu osseux engendrant le développement des ostéophytes et l'augmentation de la densité osseuse évaluée chez les patients atteints. Finalement, une corrélation entre la production de PGE₂ et d'IL-18 pourrait potentiellement être en cause. Toutes ces dernières découvertes amènent des preuves de l'importance d'atteindre la normalisation des voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄ chez les patients OA afin d'accroître l'efficacité des approches pharmacologiques actuelles gérant le processus inflammatoire de la maladie de l'OA, car ces approches pharmacologiques agissent principalement sur la production de ces deux importants médiateurs inflammatoires et que si les voies de synthèses sont perturbées, l'efficacité des médicaments pourrait également être affectée.

D'un point de vue pharmacologique, le «court-circuit» observée entre les voies de synthèse des PGs et des LTs dans les Obs OA remet aussi en cause notre approche thérapeutique de cette pathologie. Ce «court-circuit» observé dans les Obs OA avait aussi été observé dans un système de culture *ex vivo* avec des explants de la membrane synoviale de patients OA (He *et al.* 2002). Ceci nous indique qu'il ne s'agit pas d'un épiphénomène mais bien d'un problème réel. Nos présents travaux ainsi que nos découvertes passées (Paredes *et al.* 2002) indiquent clairement que l'inhibition chronique de la voie COX-2 est responsable de la stimulation de celle de la 5-LO et, par le fait même, de la production (dans l'os et la membrane synoviale) de leucotriènes beaucoup plus efficaces dans la stimulation et l'amplification de la réponse inflammatoire. L'approche thérapeutique idéale devrait donc cibler l'inhibition des deux voies COX et

5-LO (par un inhibiteur double COX/5-LO) afin de mieux gérer la douleur mais aussi possiblement la perturbation des tissus de l'articulation chez le patient OA.

Perspectives futures

Après avoir établi l'existence du «cross-talk» entre les deux voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄, voici quelques suggestions pour une étude plus approfondie de la régulation du cross-talk entre les deux voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄:

- 1-) Il faut absolument mettre au point une technique efficace de quantification des niveaux de synthèse de la protéine FLAP afin de confirmer ou d'appuyer les résultats obtenus lors de cette étude.
- 2-) Il faudrait vérifier si la corrélation retrouvée entre PGE₂ et IL-18 dans nos recherches constitue une relation entre les deux voies de synthèse de PGE₂ et de LTB₄ en : vérifiant par exemple si la relation entre IL-18 et LTB₄ serait de nature inverse ou si l'IL-18 pourrait inhiber la production de LTB₄ et en vérifiant l'effet de traitements exogènes variables de IL-18.
- 3-) Il serait également intéressant d'analyser l'action d'un inhibiteur de la 5-LO sur la synthèse de PGE₂ en : étudiant sa production endogène après le traitement des cellules par cet inhibiteur et/ou en étudiant l'expression et la régulation de son enzyme de synthèse (COX).
- 4-) Finalement, il serait intéressant de trouver de nouveaux facteurs candidats potentiels qui pourraient être impliqués dans la régulation de ce «cross-talk».

CONCLUSION

Les études faites jusqu'à présent sur les médiateurs de l'inflammation de l'arthrose se basaient beaucoup plus sur les prostaglandines (spécialement la prostaglandine E₂). Cependant, les leucotriènes (plus précisément le leucotriène B₄), en tant que médiateur de l'inflammation, seraient encore plus problématiques que les prostaglandines si on considère le rôle des leucotriènes décrit précédemment: agents chimiotactiques potentiels pour les neutrophiles humains qui peuvent augmenter la perméabilité microvasculaire et générer des superoxydes, d'où l'importance de comprendre la perturbation de l'expression de la FLAP et le mécanisme de régulation du «court-circuit» vers la voie de production de LTB₄ lors d'une inhibition à long terme de la voie de production de prostaglandines (PGE₂) dans les Obs OA. Mes travaux ont clairement démontré que l'expression de la FLAP est altérée et qu'il serait également le régulateur du mécanisme de «court-circuit». Comme il avait été antérieurement démontré que des souris knock-out pour le gène de la FLAP ne présentait aucune altération des fonctions physiologiques, mais généraient des réponses inflammatoires réduites qui seraient attribuables à l'absence de production de leucotriènes (Silverman et Drazen, 1999), l'utilisation d'une thérapie génique qui normaliserait la régulation de la FLAP ou le jumelage de cette thérapie génique à une approche pharmacologique inhibant les enzymes COX et LO (inhibiteur double) comme la Licofélone (décrite précédemment dans la section 4.1.1.3) constituerait un outil thérapeutique intéressant pour la pathologie de l'OA.

RÉFÉRENCES

- Allanore, Y et Hilliquin, P. (1999) La maladie arthrosique. Éditions ESTEM. Paris. pp. 1-62.
- Altman, R. Asch, E. Bloch, D. Bole, G. Borenstein, D. Brandt, K. Christy, W. Cooke, T. D. Greenwald, R. Hochberg, M. *et al.* (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 29(8): 1039-49.
- Argentieri, D. C. Ritchie, D. M. Ferro, M. P. Kirchner, T. Wachter, M. P. Anderson, D. W. Rosenthale, M. E. et Capetola, R. J. (1994) Tepoxalin: a dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor of arachidonic acid metabolism with potent anti-inflammatory activity and favorable gastrointestinal profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271(3): 1399-408.
- Atik, O. S. (1990) Leukotriene B₄ and Prostaglandine E₂-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 39: 253-4.
- Bailey, A. J. et Knott, L. (1999) Molecular changes in bone collagen in osteoporosis and osteoarthritis in the elderly. *Exp. Gerontol.* 34(3): 337-351.
- Baron R. (2003) General Principles of Bone Biology (Chapter 1) in: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 5ième édition. Édition J. F. Murray. Collection Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp.1-8.
- Barreda, D. R. Hanington, P. C. et Belosevic, M. (2004) Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* 28(5): 509-54.
- Bennett, C. F. Chiang, M-Y. Monia, B. P. et Crooke, S. T. (1993) Regulation of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein expression in HL-60 cells. *Biochem* 289; 33-9.
- Bertolini, A. Ottani, A. et Sandrini, M. (2001) Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol. Res.* 44(6): 437-50.
- Billingham, M. E. J. Meijers, M. H. M. Mahwinney, B. et Malcolm A. (1996) Spontaneous osteoarthritis in guinea pigs: cartilage degeneration is preceded by loss of subchondral trabecular bone (abstract). *J Rheumatol.* (suppl. 1): 104
- Bombardier, C. (2002) An evidence-based evaluation of the gastro-intestinal safety of Coxibs. *Am. J. Cardiol.* 89: 3D-9D.

- Brain, S. D. et Williams, T. J. (1990) Leukotrienes and inflammation. *Pharmac. Ther.* 46: 57-66.
- Brock, T. G. McNish, R. W. et Peters-Golden, M. (1995) Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 270 (37): 21652-58.
- Burr, D. B. (1998) The importance of subchondral bone in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 10 (3): 256-62.
- Burr, D. B. (2004) Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (Suppl. A) : S20-30.
- Canalis, E. (2003) Osteogenic Growth factors (Chapter 4) in: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 5ième édition. Édition J. F. Murray. Collection Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp.28-31.
- Canetti, C. A. Leung, B. P. Culshaw, S. McInnes, I. B. Cunha, F. Q. Et Liew, F. Y. (2003) IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF- α and leukotriene B₄. *J. Immunol.* 171: 1009-15.
- Carlson, C. S. Loeser, R. F. Jayo, M. J. Weaver, D. S. Adams, M. R. et Jerome, C. P. (1994) Osteoarthritis in *Cynomolgus macaques*: a primate model of naturally occurring disease. *J. Orthop. Res.* 12: 331-9.
- Carlson, C. S. Loeser, R. F. Purser, C. B. Gardin, J. F. et Jerome, C. P. (1996) Osteoarthritis in *Cynomolgus macaques*. III: Effects of age, gender, and subchondral thickness on the severity of the disease. *J. Bone Miner. Res.* 11: 1209-17.
- Chomczynski, P. et Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1): 156-159.
- Coffey, M. J. Wilcoxon, S. E. Phare, S. M. Simpson, R. U. Gyetko, M. R. et Peters-Golden, M. (1994) Reduced 5-lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in macrophages from 1,25-dihydroxyvitamin D₃-deficient rats. *Prostaglandins* 48(5): 313-29.
- Crooks, S. W. et Stockley, R. A. (1998) Leukotriene B₄ *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30(2): 173-8.
- Dannhardt, G. et Kiefer, W. (2001) Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.* 36: 109-26.
- Dieppe, P. Cushnaghan, J. Young, P. et Kirwan, J. (1993) Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy. *Ann. Rheum. Dis.* 52: 557-63.

- Dieppe, P. (1999) Subchondral bone should be the main target for the treatment of pain and disease progression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7 (3): 325-6.
- Dubuc, M. (1997) Mieux comprendre et traiter l'arthrose. *Recherche en santé* 15 : 32-4.
- Felson, D. T. (conference chair in 2000) Osteoarthritis: new insights. Part 1: The disease and its risk factors. *Ann. Intern. Med.* 133(8) : 635-6.
- Felson, D. T. (conference chair in 2000) Osteoarthritis: new insights. Part 2: Treatment Approaches. *Ann. Intern. Med.* 133(9) : 726-37.
- Fisher, R. C. et Scott, E. W. (1998) Role of PU.1 in hematopoiesis. *Stem cells* 16(1): 25-37.
- Fitzgerald, G. A. et Patrono, C. (2001) The Coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl. J. Med.* 345(6): 433-42.
- Ford-Hutchinson, A. (1990) Leucotriene B₄ in inflammation. *Crit. Rev. Immunol.* 10(1): 1-12.
- Funk, C. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875.
- Futani, H. Okayama, A. Matsui, K. Kashiwamura, S. Sasaki, T. Hada, T. Nakanishi, K. Tateishi, H. Maruo, S. et Okamura, H. (2002) Relation between interleukin-18 and PGE₂ in synovial fluid of osteoarthritis: a potential therapeutic target of cartilage degradation. *J Immunother.* 25(Suppl. 1): S61-S64.
- Goltzman, D. (2002) Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 1(10): 784-96.
- Griffiths, R. J. Smith, M. A. Roach, M. L. Stock, J. L. Stam. E. J. Milici, A. J. Scampoli, D. N. Eskra, J. D. Byrum, R. S. Koller, B. H. et McNeish, J. D. (1997) Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice. *J. Exp. Med.* 185(6): 1123-9.
- Grynpas, M. D. Katz, A. I. Lieberman, I. et Pritzker, K. P. H. (1991) Subchondral Bone in Osteoarthritis. *Calcif Tissue Int.* 49 (1): 20-6.
- Haq, I. Murphy, E. et Dacre, J. (2003) Osteoarthritis. *Postgrad Med J* 79 : 377-83.
- Harizi, H. Juzan, M. Moreau, J. F. et 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(1): 139-46.

Härle, D. Rådmark, O., Samuelsson, B. et Steinhilber, D. (1998) Calcitriol and transforming growth factor- β upregulate 5-lipoxygenase mRNA expression by increasing gene transcription and mRNA maturation. *Eur. J. Biochem.* 254: 275-281.

Hawkey, C. J. (1999) COX-2 inhibitors. *Lancet* 353: 307-14.

Hawkey, C. J. (2002) Cyclooxygenase inhibition: between the devil and the deep blue sea. *Gut* 50(Suppl III): iii25-iii30.

He, W. Pelletier, J-P. Martel-Pelletier, J. Laufer, S. et Di battista, J. A. (2002) Synthesis of interleukin 1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with anti-inflammatory cytokines. *J Rheumatol.* 29(3): 546-53.

Hershey, C. L. et Fisher, D. E. (2004) Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone* 34(4): 689-96.

Hilal, G. Martel-Pelletier, J. Pelletier, J-P. Ranger, P. et Lajeunesse, D. (1998) Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro. *Arthritis Rheum* 41(5): 891-899.

Hilal, G. Martel-Pelletier, J. Pelletier, J-P. Duval, N. et Lajeunesse, D. (1999) Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum* 42(10): 2112-2122.

Hinton, R. Moody, R. L. Davis, A. W. et Thomas, S. F. (2002) Osteoarthritis: Diagnosis and Therapeutic considerations. *Am. Fam. Physicians* 65 (5): 841-8.

Hogue, J. H. et Mersfelder, T. L. (2002) Pathophysiology and First-Line treatment of osteoarthritis. *Ann. Pharmacother.* 36: 679-86.

Holick, M. (2003) Vitamin D: Photobiology, Metabolism, Mechanism of Action and Clinical Applications (Chapter 20) in: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 5ième édition. Édition J. F. Murray. Collection Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp. 129-36.

Hunter, D. J. March, L. et Sambrook, P. N. (2002) Knee osteoarthritis: The influence of environmental factors. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20: 93-100.

Idelman, S. et Verdetli, J. (2000) Endocrinologie et communication cellulaires. Éditions EDP Sciences. Grenoble. pp. 332-41.

Keen, R. W. Hart, D. J. Lanchbury, J. S. et Spector, T. D. (1997) Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. *Arthritis Rheum.* 40(8): 1444-9.

Knight, E. V. Kimball, J. P. Keenan, C. M. Smith, I. L. Wong, F. A. Barrett, D. S. Dempster, A. M. Lieuallen, W. G. Panigrahi, D. Powers, W. J. et Szot, R. J. (1996) Preclinical toxicity evaluation of texapolin, a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5 lipoxygenase, in Sprague-Dawley rats and beagle dogs. *Fundam. Appl. Toxicol.* 33(1): 38-48.

Lajeunesse, D. Kiebzak, G. M. Frondoza, C. et Sacktor, B. (1991) Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner.* 14: 237-250.

Lajeunesse, D. Busque, L. Ménard, P. Brunette, M. G. et Bonny, Y. (1996) Demonstration of an osteoblast defect in two cases of human malignant osteopetrosis. *J. Clin. Invest.* 98(8) : 1835-1842.

Lajeunesse, D. Hilal, G. Pelletier, J-P. et Martel-Pelletier, J. (1999) Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 321-2.

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

Lajeunesse, D. (2004) The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (Suppl. A) : S34-8.

Lajeunesse, D. Martel-Pelletier, J. Fernandes, J. C. Laufer, S. et Pelletier, J-P. (2004) Treatment with licofelone prevents abnormal subchondral bone cell metabolism in experimental dog osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 63 : 78-83.

La Société d'arthrite du Canada : Arthroscopie 2003 (dernière mise à jour le 14/03/2003) est disponible à l'adresse internet suivante :

<http://www.arthrite.ca/resources%20for%20advocates/arthroscope/index/default.aspx?s=1>

Laufer, S. A. Augustin, J. Dannhardt, G. et 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.

Laufer, S. Tries, S. Augustin, J. et Dannhardt, G. (1994) Pharmacological profile of a new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneimittelforschung* 44(5): 629-36..

Laufer, S. Tries, S. Augustin, J. Elsasser, R. Albrecht, W. Guserle, R. Algate, D. R. Atterson, P. R. Munt, P. L. (1995) Acute and chronic anti-inflammatory properties of

[2,2-dimethyl-6-(4-chlorophenyl)-7-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-5-yl]-acetic acid. *Arzneimittelforschung* 45(1): 27-32.

Leslie, M. (2000) Knee Osteoarthritis Management Therapies. *Pain Management Nursing* 1(2) : 51-7.

Lian, J. B. Stein, G. S. et Aubin, J. E. (2003) Bone Formation: Maturation and Functional Activities of Osteoblast Lineage Cells (Chapter 3) in: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 5ième édition. Édition J. F. Murray. Collection Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp.13-28.

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

Mardini, I. A. et Fitzgerald, G. A. (2001) Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. *Mol. Interv.* 1(1): 30-38.

Marie, P. (1994) Human Osteoblastic Cells : A potential tool to assess the etiology of pathologic bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 9(12) : 1847-50.

Marie, P. (2001) Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/Sciences* 17; 1252-9.

Marieb, E. N. (1993) Anatomie et Physiologie humaines. Éditions du Renouveau Pédagogique. Canada. pp. 157-241.

Martel-Pelletier, J. et Pelletier, J-P. (2003) Osteoarthritis : recent developments. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15: 613-5.

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

Massicotte, F. Lajeunesse, D. Benderdour, M. Pelletier, J-P. Hilal, G. Duval, N. et Martel-Pelletier, J. (2002) Can altered production of interleukin-1 β , interleukin-6, transforming growth factor- β and prostaglandin E₂ by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 491-500.

Matsui, H. Shimizu, M. et Tsuji, H. (1997) Cartilage and Subchondral Bone Interaction in Osteoarthrosis of Human Knee Joint: a Histological and Histomorphometric Study. *Microsc. Res. Tech.* 37; 333-42.

Mattei, J-P. et Roux, H. (1999) New potential therapeutic goals: subchondral bone and progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7 (3): 329-30.

- Mazières, B. Cantagrel, A. Laroche, M. et Constantin, A. (2000) Guide pratique de rhumatologie. Éditions Médicales Spécialisées – MMI. Collection Médiguides. Paris. pp. 433-65.
- McCarthy, T. L. Ji, C. Shu, H. Casinghino, S. Crothers, K. Rotwein, P. et Centrella, M. (1997) 17β -Estradiol Potently Suppresses cAMP-induced Insulin-like Growth Factor-I Gene Activation in Primary Rat Osteoblast Cultures. *J. Biol. Chem.* 272 (29): 18132-9.
- Mokassa Bakumobatane, L. Dequeker, J. Raymaekers, G. et Aerssens, J. (1993) Effect of osteoarthritis (OA) and body weight on subchondral cancellous bone quality of proximal tibia. *Osteoarthritis Cartilage* 1 : 55-6.
- Moskowitz, R. W. Howell, D. S. Goldberg, V. M. et Mankin, H. J. (1992) Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management 2ième édition. Éditions W. B. Saunders. Philadelphie. pp. 1-620
- Mundy, G. R. Chen, D. et Oyajobi, B. O. (2003) Bone Remodeling (Chapter 7) in: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 5ième édition. Édition J. F. Murray. Collection Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. pp. 46-57.
- Nickerson-Nutter, C. L. et Medvedeff, E. D. (1996) The effect of leukotriene synthesis inhibitors in models of acute and chronic inflammation. *Arthritis Rheum.* 39(3): 515-21.
- Niethard, F. U. (1999) Pathogenesis of Osteoarthritis – Approaches to Specific Therapy. *Am. J. Orthop.* 28 (Suppl. 11): 8-10.
- Ortega, N. Behonick, D. Stickens, D. et Werb, Z. (2003) How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 995: 109-16.
- Paredes, Y. Massicotte, F. Pelletier, J-P. Martel-Pelletier, J. Laufer, S. et Lajeunesse, D. (2002) Study of the role of leukotriene B₄ in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts. *Arthritis Rheum.* 46(7): 1804-12.
- Peskar, B. M. Maricic, N. Gretzer, B. Schuligoi, R. et Schmassmann, A. (2001) A role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. *Life Sci.* 69: 2993-3003.
- Peters-Golden, M. et Brock, T. G. (2003) 5-Lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69(2-3): 99-109.
- Poole, A. R. (1999) An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience* 4: d662-70.

- Radin, E. L. Paul, I. L. et Tollkof, M. J. (1970) Subchondral bone change in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum.* 12: 400-405.
- Rådmark, O. P. (2000) The molecular biology and regulation of 5-Lipoxygenase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161: S11-5.
- Reid, G. K. Kargman, S. Vickers, P. J. Mancini, J. A. Léveillé, C. Ethier, D. Miller, D. K. Gilliard, J. G. Dixon, R. A. F. et Evans, J. F. (1990) Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase and cellular leukotriene synthesis. *J. Biol. Chem.* 265(32): 19818-23.
- Ren, W. et Dziak, R. (1991) Effects of leukotrienes on osteoblastic cell proliferation. *Calcif. Tissue Int.* 49: 197-201.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F. et Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2^{ème} édition Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp.18.50-55.
- Sandy, J. R. Meikle, M. C. Martin, B. R. et Farndale, R. W. (1991) Leukotriene B4 increases intracellular calcium concentration and Phosphoinositide metabolism in mouse osteoblasts via cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-independent pathways. *Endo.* 129(2): 582-90.
- Silverman, E. S. et Drazen, J. M. (1999) The biology of 5-lipoxygenase: function, structure and regulatory mechanisms. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111(6): 525-36.
- Smith, P. K. Krohn, R. I. Hermanson, G. T. Mallia, A. K. Gartner, F. H. Provenzano, M. D. Fujimoto, E. K. Goeke, N. M. Olson, B. J. et Klenk, B. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1):76-85
- Sokoloff, L. (1993) Microcracks in the calcified layer of articular cartilage. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117(2): 191-5.
- Sowers, M. (2001) Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13 (5): 447-51.
- Spector, T. D. et MacGregor, A. J. (2004) Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12(Suppl. A): S39-44.
- Steinilber, D. (1994) 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm. Acta Helv.* 69(1): 3-14.
- Tries, S. Neupert, W. et 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.

- Udagawa, N. Horwood, N. J. Elliott, J. Mackay, A. Owens, J. Okamura, H. Kurimoto, M. Chambers, T. J. Martin, T. J. et Gillespie, M. T. (1997) Interleukin-18 (Interferon- γ -inducing Factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- γ to inhibit osteoclast formation. *J. Exp. Med.* 185(6): 1005-12.
- Vaillancourt, G. (1990) Arthrite et rhumatisme. 2^{ème} Édition Vigot. Collection L'omnipraticien. Québec. pp. 80-87.
- Vickers, P. J. (1995) 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP). *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 12(2-3): 185-94.
- Waldman, S. A. Vitow, C. Osborne, B. Gillen, L. Argentieri, D. C. Wong, F. A. Smith, I. L. Chow, A. T. Misiti, J. et Bjornsson, T. D. (1996) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tepoxalin after single oral dose administration to healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 36(5): 462-8.
- Wallace, J. L. Carter, L. McKnight, W. Tries, S. et Laufer, S. (1994) ML3000 reduces gastric prostaglandin synthesis without causing mucosal injury. *Eur. J. Pharmacol.* 271(2-3): 523-31.
- Wallace, J. L. et Del Soldato, P. (2003) The therapeutic potential of NO-NSAIDs. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17: 11-20.
- Watrous, D. A. et Andrews, B. S. (1989) The metabolism and immunology of bone. *Semin Arthritis Rheum* 19(1): 45-65.
- Werz, O. Klemm, J. Samuelsson, B. et Rådmark, O. (2000) 5-Lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97(10): 5261-66.
- Westacott, C. I. Webb, G. R. Warnock, M. G. Sims, J. V. et Elson, C. J. (1997) Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum.* 40 (7); 1282-91.
- Wong, S., Lee, S. J. Frierson, M. R. (3rd) Proch, J. Miskowski, T. A. Rigby, B. S. Schmolka, S. J. Naismith, R. W. Kreutzer, D. C. et Lindquist, R. (1992) Antiarthritic profile of BF-389—a novel anti-inflammatory agent with low ulcerogenic liability. *Agents Actions* 37(1-2): 90-8.
- Woods, J. W. Evans, J. F. Ethier, D. Scott, S. Vickers. P. J. Hearn, L. Heibein, J. A. Charleson, S. et Singer, I. I. (1993) 5-Lipoxygenase and 5-Lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leucocytes. *J. Exp. Med.* 178: 1935-46.

Yopp, A. C. Randolph, G. J. et Bromberg, J. S. (2003) Leukotrienes, Sphingolipids and Leucocyte trafficking. *J. Immunol.* 171(1): 5-10.