

Université de Montréal

**Mécanisme d'action de l'endothéline-1 (ET-1) dans les
chondrocytes articulaires des patients arthrosiques**

par

Cristina Alexandra Manacu

Département de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science (M. Sc.)
en Sciences Biomédicales,
option Recherche clinique

novembre 2004

W

4

U58

2005

V. 042

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 intitulé :

**Mécanisme d'action de l'endothéline-1 (ET-1) dans les chondrocytes
articulaires des patients arthrosiques**

11615615

présenté par

Cristina Alexandra Manacu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Daniel Lajeunesse
président-rapporteur

Dr. Florina Moldovan
directeur de recherche

Dr. Alain Moreau
membre du jury



RÉSUMÉ

Lors de l'arthrose, plusieurs changements structuraux et biochimiques surviennent au niveau de la composante collagénique du cartilage. L'endothéline (ET-1) agit sur la régulation de la MMP-1 et la MMP-13, deux enzymes clés dans la dégradation du collagène de type II. Dans ce travail, nous avons caractérisé le mécanisme d'action de l'ET-1 sur ces deux métalloprotéases et sur l'oxyde nitrique.

Les chondrocytes arthrosiques humains ont été cultivés en présence ou en absence d'ET-1, d'inhibiteurs de protéine kinase et de la guanylate cyclase. Les MMP-1, MMP-13, et le NO ont été quantifiés par ELISA et par la réaction de Griess. L'iNOS, les MAP kinases et l'Akt ont été détectés par Western Blot.

Nous avons démontré que l'ET-1 induit la production de la MMP-1 et MMP-13, le relâchement du NO et l'expression d'iNOS. L'inhibiteur de la guanylate cyclase a provoqué une suppression de la production basale et induite par ET-1 des MMP-1, -13 et du NO. L'inhibiteur de la p38 MAP kinase, quant à lui, a supprimé seulement la production induite par l'ET-1 de ces deux MMP. De la même manière, la production du NO induite par l'ET-1 a été supprimée partiellement par l'inhibiteur de la p38 kinase et supprimée complètement par l'inhibiteur de la PKA.

Dans les chondrocytes OA, l'ET-1 contrôle la production de la MMP-1, de la MMP-13 et le relâchement du NO suite à l'induction d'iNOS. L'ET-1 et le NO pourraient donc constituer des cibles thérapeutiques dans le traitement qui vise à bloquer les altérations structurales du cartilage.

Mots clés : ET-1, arthrose, oxyde nitrique, métalloprotéases, voies de signalisation, apoptose

SUMMARY

Several structural and biochemical changes involving the collagenous component of the cartilage matrix occur during osteoarthritis. We previously demonstrated that endothelin-1 acts on the regulation of MMP-1 and MMP-13, which are two key enzymes in the degradation of the collagen type II. In this work, we investigated the mechanism by which ET-1 induces the production of these two MMPs and of NO.

Human OA chondrocytes were cultured in the presence or in the absence of ET-1 and of inhibitors of protein kinases or inhibitor of soluble guanylate cyclase. MMP-1, MMP-13 and NO levels were measured by ELISA and Griess reaction, respectively. Additionally, iNOS and activated forms of MAP kinases and serine threonine kinase Akt were determined by Western blot.

We have demonstrated that ET-1 greatly increased MMP-1 and MMP-13 production, NO release and iNOS expression. Inhibitor of guanylate cyclase decreased the production of both MMPs below basal levels, whereas the inhibitor of p38 kinase suppressed ET-1 stimulated production only. Similarly, the ET-1-induced NO production was partially suppressed by the p38 kinase inhibitor and completely suppressed by the PKA kinase inhibitor and basal production was suppressed by guanylate cyclase inhibitor.

In human OA chondrocytes, ET-1 controls the production of MMP-1 and MMP-13. ET-1 also induces NO release via iNOS induction. Thus, ET-1 and NO should become important target molecules for future therapies aimed at stopping cartilage destruction.

Key words: ET-1, osteoarthritis, nitric oxide, metalloproteases, signaling pathways, apoptosis

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	i
SUMMARY	ii
TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
REMERCIEMENTS	xi
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II : REVUE DE LA LITTERATURE	4
1. ENDOTHÉLINE ET L'ARTHROSE	5
1.1. Endothéline-1 – généralités.....	5
1.2. Endothéline-1 dans les tissus articulaires.....	8
2. CYTOKINES PRO INFLAMMATOIRES ET ARTHROSE.....	10
3. DEGRADATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE.....	13
3.1. Structure du cartilage articulaire	13
3.1.1. Chondrocytes articulaires.....	13
3.1.2. Matrice extracellulaire.....	16
3.1.2.1. Collagène.....	16
3.1.2.2. Agrécanes.....	18
3.2. Catabolisme du cartilage articulaire.....	20
3.2.1. Collagenases.....	20
3.2.1.1. Famille des métalloprotéases	20

3.2.1.2. Collagénases dans le cartilage.....	20
3.2.1.3. Voies de signalisation activées par les cytokines	22
3.2.2. Agrécanases.....	24
4. VOIES DE SIGNALISATION DE L'ENDOTHÉLINE-1	26
4.1. Récepteurs de l'endothéline-1	26
4.2. Voie de phospholipase C et flux du calcium.....	28
4.3. Protéine kinase C.....	29
4.4. Voie de phospholipase A2	30
4.5. Voie de phospholipase D	30
4.6. Voie de l'AMPc et protéine kinase A	31
4.7. Voie du GMPc et de l'oxyde nitrique	32
4.8. Voie des MAP kinases	36
4.8.1. La voie ERK1/2.....	38
4.8.2. La voie de p38 MAP kinase	40
4.8.3. La voie de SAPK/JNK	41
4.9. La voie de PI3 kinase	42
5. L'APOPTOSE.....	43
5.1. Apoptose dans le cartilage articulaire	45
5.2. Régulateurs de l'apoptose	46
5.2.1. Les composants de la matrice extracellulaire.....	46
5.2.2. Les agressions mécaniques.....	47
5.2.3. L'oxyde nitrique.....	48
5.2.4. Les récepteurs de la mort	48

5.2.5. La mitochondrie	49
5.3. Inhibiteurs de l'apoptose chondrocytaire	49
5.3.1. La famille des protéines Bcl-2	49
6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	52
CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES	53
Sélection des spécimens	54
Culture cellulaire	54
La méthode ELISA pour la quantification des MMP-1 et MMP-13.....	55
La méthode Griess pour le dosage d'oxyde nitrique (NO)	56
Étude de l'effet de l'ET-1, des protéine kinases et de guanylate cyclase sur la production des MMP-1 et MMP-13 et du NO.	57
Western blot	58
Apoptose.....	61
L'analyse statistique.....	62
CHAPITRE IV : MANUSCRIT	63
CHAPITRE V : DISCUSSION.....	97
CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	108
CHAPITRE VII: RÉFÉRENCES	114
CHAPITRE VIII : ANNEXE.....	140
L'acceptation de l'article (lettre de l'éditeur)	141
Figure 1 – L'effet de l'ET-1 sur l'apoptose chondrocytaire	142
COMMUNICATIONS PAR AFFICHE	143
COMMUNICATIONS ORALES	146

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE II : REVUE DE LA LITTERATURE

Tableau I – Antagonistes des récepteurs de l'endothéline.....	28
Tableau II – La terminologie des MAPK.....	37
Tableau III – Comparaison entre l'apoptose et la nécrose.....	44

CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau IV – Inhibiteurs de protéines kinases et de guanylate cyclase.....	57
Tableau V – Anticorps primaires utilisés pour analyse par Western blot.....	59
Tableau VI – Anticorps secondaires utilisés pour analyse par Western blot.....	60

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE II : REVUE DE LA LITTERATURE

Figure 1 - La synthèse de l'endothéline-1.....	7
Figure 2 - La représentation schématique du cartilage articulaire.....	14
Figure 3 - L'induction de la production de GMPc par l'NOS synthase.....	34
Figure 4 - L'induction de la cascade des MAPK par l'ET-1.....	38

CHAPITRE IV : MANUSCRIT

Figure 1 - Effect of protein kinase inhibitors and LY83583 on ET-1-induced MMP-13 and MMP-1 production by human OA chondrocytes.....	88
Figure 2 - Effect of ET-1 on NO release and iNOS expression by human OA chondrocytes.	89
Figure 3 - Phosphorylation of p38 MAP kinase, Akt, p44/42 and SAP/JNK by ET-1 in human OA chondrocytes.....	90

CHAPITRE V : DISCUSSION

Figure 1 - Mécanisme d'action de l'ET-1.....	107
--	-----

CHAPITRE VIII : ANNEXE

Figure 1 - L'effet de l'ET-1 sur l'apoptose chondrocytaire.....	142
---	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	acides aminés
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADAM-TS	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motif
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
Bax	Bcl-2-associated protein X
Ca ²⁺ i	calcium intracellulaire
COX-2	cyclooxygénase-2
DAG	diacylglycérol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
eNOS	synthase d'oxyde nitrique endothéliale
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase
ET	endothéline
ET _A	récepteur de type A de l'endothéline
ET _B	récepteur de type B de l'endothéline
FasL	Fas ligand
GAP	GTPase activating protein
GCS	guanylate cyclase soluble
GDP	guanosine diphosphate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique

GTP	guanosine triphosphate
IL	interleukine
IL-1 β	interleukine-1 β
iNOS	synthase d'oxyde nitrique inductible
IP3	inositol 1,4,5-triphosphate
IP3K	inositol triphosphate kinase
L-NIL	N-iminoethyl-L-lysine
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	mitogen activated kinase
MAPKK	mitogen activated kinase kinase
MAPKKK	mitogen activated kinase kinase kinase
MMP	métalloprotéases de la matrice
NF-kB	facteur nucléaire de type kappa B
NNOS	synthase d'oxyde nitrique neuronale
NO	oxyde nitrique
NOS	synthase d'oxyde nitrique
OA	arthrose
PGE2	prostaglandine E2
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLA2	phospholipase A2
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D

POD	peroxydase conjuguée
PTK	protéines tyrosines kinases
RCGP	récepteurs couplés aux protéines G
SAP/JNK	stress-activated protein kinase/ c-jun N-terminal kinase
TBS	Tris-buffered saline
TGF	tumor growth factor (facteur de croissance des tumeurs)
TIMP	inhibiteur tissulaire des MMP
TNF- α	tumor necrosis factor alpha (facteur de nécrose des tumeurs)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-end Labeling
UV	ultra violet

REMERCIEMENTS

Toute ma gratitude va au Dr Florina Moldovan, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli dans son équipe, ensuite pour l'intérêt manifesté à ma formation scientifique, pour son aide précieuse et son soutien tout au long de ce travail. Qu'elle soit assurée de toute ma reconnaissance !

Je remercie chaleureusement tous mes collègues de laboratoire : Séverine Leclerc, Fazool Shipkolye, Marjolaine Roy-Beaudry, Mélanie Felx, Kareen Letellier, Louis-Olivier Lévesque et Geneviève Dubuc pour toute leur aide, pour leur support scientifique et linguistique et pour tous les bons moments partagés.

J'exprime aussi toute ma reconnaissance à ma famille, pour leur soutien et leurs encouragements pendant ma maîtrise.

À ma fille, Anya.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

L'arthrose est une affection articulaire chronique, dégénérative et non inflammatoire des articulations. Elle se caractérise anatomiquement par l'altération destructive des cartilages et par des remaniements osseux causés par la production d'ostéophytes et de chondrophytes. Cliniquement, elle se manifeste principalement par des douleurs et des déformations. Les chondrocytes articulaires jouent un rôle actif dans le développement de la maladie puisqu'ils assurent l'homéostasie du cartilage en maintenant l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme. L'arthrose, une des maladies chroniques les plus fréquentes, est le résultat de l'incapacité des chondrocytes à maintenir l'équilibre homéostatique entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Plusieurs facteurs sont impliqués dans le dysfonctionnement métabolique de l'arthrose tels que les métalloprotéases, les cytokines pro-inflammatoires, l'oxyde nitrique, l'apoptose. Outre ces facteurs, nous avons identifié récemment l'endotheline-1, un peptide de 21 acides aminés, qui pourrait jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'arthrose (Roy-Beaudry et al., 2003).

Notre laboratoire a démontré que l'ET-1, synthétisée entre autre par les chondrocytes, a des propriétés cataboliques dans le cartilage articulaire. Lors de l'arthrose, une surproduction de l'ET-1 est observée surtout dans les zones superficielles du cartilage arthrosique. Les travaux de Roy-Beaudry et al. (2003) ont montré que l'ET-1 agit sur la régulation de la collagenase-1 (MMP-1) et de la collagenase-3 (MMP-13). En présence d'ET-1, une fragmentation accrue du collagène de type II a été observée. Celle-ci pourrait provenir de l'hyperexpression des collagénases MMP-1 et MMP-13.

Les deux collagénases MMP-1 et MMP13 font partie de la famille de métalloprotéases (enzymes protéolytiques dépendantes du zinc) qui est constituée de plusieurs sous-

groupes: collagénases, gélatinases, stromélysines, MMP de type membranaire et autres MMP. Dans l'ensemble, toutes ses enzymes ont la capacité de remodeler la matrice extracellulaire, chacune ayant un rôle spécifique. Les collagénases MMP-1 et MMP-13 ont la propriété de cliver le collagène de type II (génèrent des néoépitopes) et jouent ainsi un rôle actif dans la progression de l'arthrose humaine.

L'oxyde nitrique, un autre facteur impliqué dans l'arthrose, induit la synthèse et l'activation des MMP et par la suite, la dégradation de la matrice extracellulaire. Une accumulation de NO peut être associée à l'apoptose. Dans des modèles d'arthrose expérimentaux de chien, l'inhibition sélective d'iNOS protège la progression des lésions de l'articulation arthrosique, réduit la présence des ostéophytes et l'inflammation synoviale (Pelletier et al., 1998).

Dans cette étude, notre objectif a été de caractériser le mécanisme d'action de l'ET-1 dans l'induction de la production des MMP-1, MMP-13 et du NO, en analysant les voies de signalisation empruntées par l'ET-1 pour contrôler la production de ces molécules.

**CHAPITRE II : REVUE DE LA
LITTERATURE**

1. ENDOTHÉLINE ET L'ARTHROSE

L'arthrose ou ostéoarthrite est une arthropathie destructive et jusqu'à présent irréversible des tissus de l'articulation. Selon Santé Canada, l'arthrose touche environ 10% des canadiens adultes. Les principaux tissus affectés sont le cartilage, les lésions du cartilage étant les plus précoces et les plus graves, la membrane synoviale et l'os sous-chondral. Ces lésions commencent généralement dans la région où les contraintes mécaniques sont les plus fortes (Ryckewaert A., 1987). Le cartilage se fibrille et les fissures suivent le plan des fibres de collagènes parallèlement à la surface de l'os puis perpendiculairement à elle. La fissuration du cartilage fait suite à la fibrillation jusqu'à mettre à nu l'os sous-chondral. Pendant que le cartilage dégénère, l'os sous-chondral s'hypertrophie et des ostéophytes apparaissent (Martel-Pelletier et al., 2000). Une inflammation synoviale secondaire s'ajoute souvent à ces lésions chondro-osseuses (Ryckewaert A., 1987).

1.1. Endothéline-1 – généralités

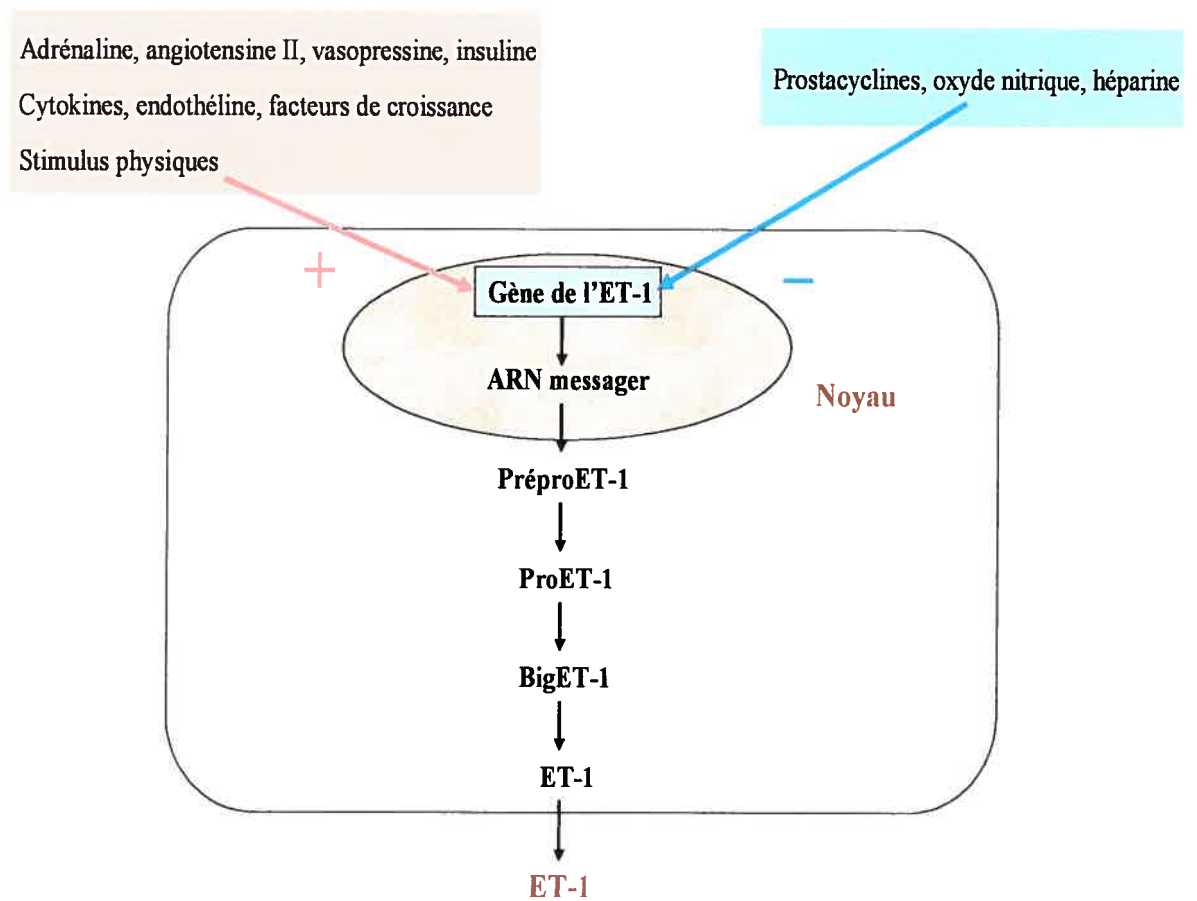
L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide de 21 acides aminés avec un poids moléculaire de 2,49 kDa. Initialement, l'ET-1 a été mise en évidence dans le milieu de culture de cellules endothéliales de l'aorte (Yanagisawa et al., 1988). De nombreux articles sur l'ET-1 ont été publiés ces dernières années montrant ainsi l'intérêt d'étudier cette molécule. Plusieurs travaux ont montré la présence de l'ET-1 dans divers types cellulaires : cellules rénales, cancéreuses, hépatiques, épithéliales, endométriales,

ovariennes, trachéales et aussi dans les fibroblastes, macrophages, myocytes cardiaques, ostéoblastes et récemment dans les synoviocytes et les chondrocytes.

Le produit initial du gène de l'ET-1 est prépro-ET-1, un peptide constitué de 212 acides aminés. Prépro-ET-1 est transformé en pro-ET par la furine, une convertase de type subtilisine (Blais et al., 2002). Puis, elle est clivée donnant un peptide de 38 acides aminés appelé Big ET-1 (D'Orléans-Juste et al., 2003). La Big ET-1 est ensuite coupée au niveau de la liaison tryptophane-valine formant l'ET-1. Le clivage est effectué principalement par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Xu D. et al., 1994). L'ECE a un rôle physiologique très important puisque l'ET-1 est beaucoup plus vasoconstrictrice que la Big ET-1. Il existe trois isoformes de l'ECE : l'ECE-1, l'ECE-2 et l'ECE-3. L'ECE-1 possède quatre isoenzymes : ECE-1a, 1b, 1c et 1d. (Ihling et al., 2001). Toutes ces enzymes pourraient constituer une cible pharmacologique potentielle dans les pathologies caractérisées par une hyperproduction d'ET-1.

Les études sur le génome humain ont démontré l'existence de deux autres isoformes d'endothéline : l'endothéline-2 (ET-2) et l'endothéline-3 (ET-3) (Inoue et al., 1989). Le gène de l'ET-2 est surtout exprimé dans le gros intestin tandis que le gène de l'ET-3 dans le cerveau, le rein, le placenta, le poumon et l'intestin (MacCumqaber et al., 1989). Ces deux isoformes d'endothéline ont un rôle méconnu et leur expression dans les tissus articulaires n'a pas été démontrée.

Figure 1 - La synthèse de l'endothéline-1



1.2. Endothéline-1 dans les tissus articulaires

Dans les maladies articulaires, la concentration d'ET-1 est augmentée dans le liquide synovial provenant d'articulations de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, d'arthrose et de goutte (Miyasaka et al, 1992) comparée aux niveaux détectés chez les sujets normaux. Dans la membrane synoviale humaine, l'ET-1 est produite par les synoviocytes (Yoshida et al, 1998), suggérant l'implication de l'ET-1 dans l'inflammation synoviale. Des taux augmentés d'ET-1 ont également été constatés dans le sérum de patients atteints d'arthrite rhumatoïde lorsque ceux-ci sont comparés aux taux détectés dans le sérum de sujets normaux (Haq et al., 1999). Dans le cartilage articulaire, l'ET-1 est synthétisée non seulement par les synoviocytes mais aussi par les chondrocytes. Les travaux de Khatib et al., (1997b et 1998) montrent la synthèse locale de l'ET-1 par les chondrocytes articulaires de souris. Récemment, notre laboratoire a démontré l'expression et la synthèse de l'ET-1 *in situ*, dans le cartilage et la membrane synoviale normaux et arthrosiques. Dans le cartilage articulaire humain, l'ET-1 a été trouvée préférentiellement dans la zone superficielle, tandis que dans la membrane synoviale, elle a été détectée au niveau de la couche bordante et des vaisseaux sanguins. L'expression et la synthèse de l'ET-1 ont été davantage retrouvées dans les tissus arthritiques que dans les tissus normaux (Roy-Beaudry et al., 2003) où elle exerce des effets cataboliques de concert avec les cytokines pro-inflammatoires qui sont les principaux agents qui induisent la synthèse et l'activité des enzymes collagénolytiques (Reboul et al., 1996).

L'ET-1 stimule aussi la production de fibronectine et de collagène dans les synoviocytes (Gutierrez et al, 1996). L'ET-1 serait impliquée dans la modulation de la prolifération cellulaire ainsi que dans la synthèse des protéoglycanes et du collagène dans les chondrocytes de souris (Khatib et al, 1998). Il est également connu que l'ET-1 inhibe la biosynthèse des protéoglycanes dans les chondrocytes de souris âgées (Khatib et al., 2002). Dans les chondrocytes costaux de lapin, l'ET-1 augmente la synthèse de l'ADN et l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane cellulaire (Stoiljkovic et al., 1994).

Les effets de l'ET-1 sont médiés par ses récepteurs spécifiques, ETA et ETB. Les chondrocytes articulaires expriment les deux récepteurs, avec une prédominance des récepteurs de type ETA qui sont exprimés davantage chez les rats âgés (Khatib et al, 1998), suggérant que le vieillissement des chondrocytes est associé à la surproduction de l'ET-1 et du récepteur ETA.

Dans les chondrocytes, l'ET-1 en se liant à ses récepteurs induit deux effets opposés sur l'activité mitotique des chondrocytes (Khatib et al, 1997a) et sur la synthèse de protéoglycanes et du collagène (Khatib et al, 2002). En effet, ces résultats montrent que l'ET-1 exerce un effet biphasique sur le métabolisme chondrocytaire : une stimulation initiale (effet à court terme) et par la suite une inhibition (effet à long terme) due à la production très élevée de l'oxyde nitrique (NO) et du GMP cyclique (Khatib et al, 1997c, 2002). Ainsi, la stimulation de l'ET-1 induit la production de l'AMPc via la protéine kinase C (PKC), qui induit à court terme la synthèse de l'ADN et des protéoglycanes (Khatib et al, 1998). Le mécanisme d'action de l'ET-1 dans les chondrocytes est très complexe et implique plusieurs seconds messagers.

2. CYTOKINES PRO INFLAMMATOIRES ET ARTHROSE

Parmi les différentes cytokines, l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) jouent un rôle majeur dans l'articulation. Sous leur action, de nombreuses cellules produisent des médiateurs lipidiques, des enzymes protéolytiques, des radicaux libres et des chemokines, qui sont des facteurs impliqués dans l'entretien du processus inflammatoire. L'IL-1 et le TNF sont responsables de nombreux effets systémiques.

Les monocytes/macrophages sont les sources majeures de cytokines, mais d'autres cellules (neutrophiles, cellules endothéliales, cellules épithéliales, mastocytes) peuvent être également impliqués dans la production de cytokines.

Les cytokines pro-inflammatoires ont été trouvées dans le liquide synovial de patients avec polyarthrite rhumatoïde. Elles ont un rôle de médiateurs principaux dans les pathologies articulaires (Kimball et al., 1988). Dans les articulations, le TNF, l'IL-1 et l'IL-6 sont produits par les macrophages, synoviocytes, mastocytes, cellules endothéliales, fibroblastes et chondrocytes. À leur tour, ces cytokines pro-inflammatoires stimulent les chondrocytes, ostéoclastes, ostéoblastes, fibroblastes et synoviocytes (Kimball et al., 1990).

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires ont été identifiées dans les tissus de l'articulation arthrosique. Les principaux médiateurs impliqués dans la dégradation de l'articulation sont le TNF- α , IL-6, IL-17, IL-18 et surtout l'IL-1 β . L'action de l'IL-1 β et du TNF- α reste à déterminer : est-ce que ces cytokines agissent de façon indépendante, en accord ou de manière hiérarchique?

L'IL-1 est la plus importante cytokine impliquée dans le processus catabolique lors de l'arthrose. Elle stimule la dégradation du cartilage, en diminuant la synthèse des protéoglycanes et du collagène et en augmentant la synthèse des enzymes protéolytiques. De même, l'IL-1 inhibent certains inhibiteurs d'enzymes protéolytiques, dont les TIMP (Martel-Pelletier et al., 1999).

Par ailleurs, l'IL-1 augmente la production par les chondrocytes de médiateurs de l'inflammation, comme la phospholipase A2 et la prostaglandine E2 (Pelletier et al., 1991). L'IL-1 β apparaît être un agent impliqué dans la nociception articulaire, puisque l'IL-1 β produit une hyperalgésie dans l'articulation de rat (Ferreira et al., 1993). L'IL-1 β stimulent la production des médiateurs de la douleur, comme la prostaglandine E2 (PGE2) via la COX-2 et l'oxyde nitrique via l'iNOS. L'IL-1 β induit aussi les récepteurs bradykininiques, B1 et B2, impliqués dans l'inflammation et la douleur.

Le TNF- α qui joue aussi un rôle important dans le catabolisme articulaire est principalement impliqué dans le processus inflammatoire plutôt que dans la dégradation des macromolécules de la matrice extracellulaire (Van de Loo et al., 1995). Il est aussi un des médiateurs de l'apoptose dans les chondrocytes (Aizawa et al., 2001).

Dans l'arthrose, la cytokine IL-6 agit sur l'augmentation des cellules inflammatoires dans le tissu synovial, sur la stimulation de la prolifération des chondrocytes et sur l'amplification des effets de l'IL-1 sur la synthèse des MMP (Martel-Pelletier, 1999).

L'IL-17 est une autre cytokine qui a un impact dans l'arthrose. Elle induit l'activation de MMP et de plusieurs cytokines pro-inflammatoires : IL-1 β , TNF- α et IL-6 (Jovanovic et al., 1998). Elle augmente aussi la production de NO dans les

chondrocytes (Attur et al., 1997). De plus, l'IL-17 agit en synergie avec l'IL-18 et le TNF- α sur l'induction de certains facteurs cataboliques (Martel-Pelletier et al., 1999). L'IL-18 est produite par les chondrocytes (Saha et al., 1999) et elle stimule l'expression du NO, de la cyclooxygénase-2 et de la stromélysine-1. De plus, l'IL-18 augmente la libération des glycosaminoglycanes du cartilage (Olee et al., 1999).

Dans des modèles d'arthrose expérimentaux chez l'animal, lorsque l'activité de l'IL-1 est bloquée, la destruction du cartilage est prévenue (Van de Loo et al., 1955) et quand l'activité du TNF- α est bloquée, l'inflammation est diminuée (Plows et al., 1995).

Des études préliminaires ont suggéré l'existence d'une synergie entre l'endothéline-1 et l'IL-1 β . Cette synergie serait le résultat d'une interaction moléculaire très complexe parce que l'ET-1 module l'IL-1 β (Didier et al., 2003) et aussi parce que les cytokines pro-inflammatoires sont capables d'augmentées l'expression de l'ET-1. Ces cytokines pro-inflammatoires augmentent la production de l'ET-1 de manière dose dépendante (Khatib et al., 1997b). Des études additionnelles sont nécessaires pour comprendre la relation entre l'ET-1 et l'IL-1 β et pour clarifier leur action synergique sur la destruction du cartilage.

3. DEGRADATION DU CARTILAGE ARTICULAIRE

3.1. Structure du cartilage articulaire

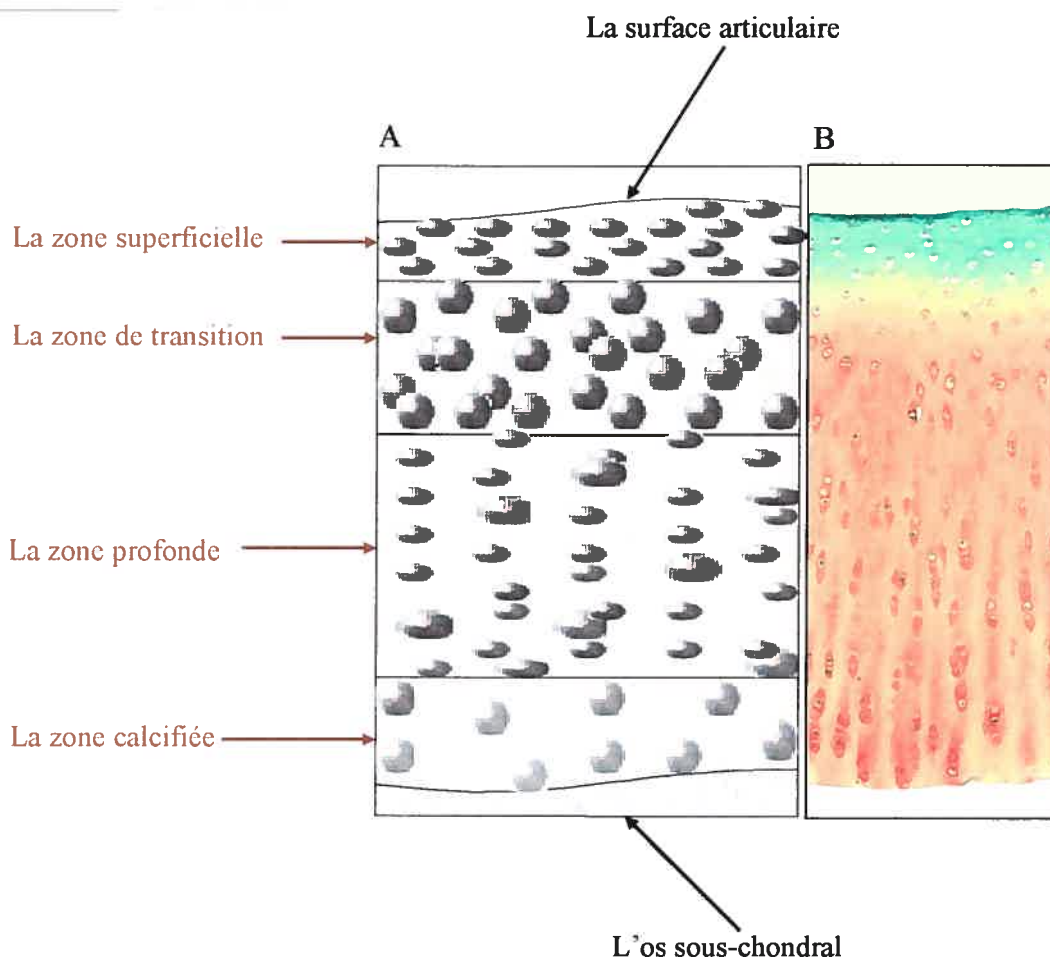
Le cartilage articulaire est un cartilage hyalin qui recouvre les surfaces articulaires de toutes les diarthroses. Il est dépourvu de nerf, de vaisseaux sanguin et lymphatique. Sa structure est étroitement adaptée à ses deux fonctions : transmission des charges et glissement des surfaces articulaires. Le cartilage articulaire est constitué d'un petit nombre de cellules hautement spécialisées, les chondrocytes, d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante composée principalement de fibres de collagène de type II, IX et XI et de protéoglycanes. Le maintien de son intégrité, donc de sa fonctionnalité, dépend de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de ses composantes.

3.1.1. Chondrocytes articulaires

Le chondrocyte est le seul type cellulaire rencontré dans le cartilage. L'ensemble des chondrocytes n'occupe que 10% du volume total (Stockwell, 1979). Cette densité cellulaire varie en fonction de la profondeur du cartilage. En surface, les chondrocytes sont plus nombreux, isolés, petits et allongés (avec l'axe long parallèle à la surface). Plus en profondeur, dans la zone de transition, ils sont moins nombreux, arrondis, plus gros et souvent groupés par deux ou trois. Dans les couches profondes, ils sont de nouveau plus petits et alignés obliquement ou verticalement formant des colonnes très

Figure 2 –A : représentation schématique du cartilage articulaire, B : coupe histologique de cartilage articulaire (coloration à la safranine-0 et au bleu de toluidine).

Quatre zones peuvent être différenciées depuis la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral. La zone superficielle est caractérisée par la présence de nombreux chondrocytes qui sont petits, allongés et qui synthétisent une plus forte grande quantité de collagène et une plus faible quantité de protéoglycanes. La zone de transition est plus riche en protéoglycanes et les chondrocytes y sont moins nombreux, arrondis, plus gros et souvent groupés par deux ou trois. La zone profonde contient la plus grande quantité de protéoglycanes et les chondrocytes sont alignés obliquement ou verticalement formant des colonnes. Enfin, la zone calcifiée se caractérise par des chondrocytes sphériques dans des lacunes non calcifiées et de cartilage en voie de calcification.



caractérisées. La zone du cartilage calcifié est caractérisée par des chondrocytes sphériques dans des lacunes non calcifiées (Mitrovic et al., 2000).

De nombreuses études montrent que les chondrocytes sont des cellules actives impliquées dans la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Les chondrocytes en assurent l'homéostasie dans des conditions normales en maintenant l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme. Ils sont non seulement capables de produire la matrice extracellulaire mais également de la détruire. Les chondrocytes élaborent et dégradent en permanence les constituants de la MEC et assurent l'intégrité structurale du cartilage. Les études *in vitro* sur les chondrocytes montrent qu'ils sont impliqués dans la modulation de la prolifération cellulaire, ainsi que dans la synthèse des protéoglycanes et du collagène (Khatib et al., 1998). De plus, les chondrocytes synthétisent d'autres molécules tels que les lipides, des cytokines pro-inflammatoires, des enzymes protéolytiques, des facteurs de croissance, etc... (Goldring, 2000). Les chondrocytes sont donc isolés dans une matrice extracellulaire volumineuse qui n'est pas innervée, ni vascularisée. Ils présentent un taux de renouvellement cellulaire réduit, ce qui donne au cartilage une prédisposition aux conditions dégénératives comme l'arthrose (Archer et Francois-West, 2002).

Au cours de l'arthrose, deux phases se succèdent pour conduire à la destruction articulaire. Au début, les chondrocytes sont nombreux puis leur nombre diminue (Boissier, 1996). La première phase est réactionnelle, les chondrocytes sont stimulés par des facteurs de croissance et deviennent hyperactifs avec prolifération de chondrocytes en amas (clones chondrocytaires) autour des fissures du cartilage. Les chondrocytes qui forment ces clones sont altérés du point de vue métabolique et

morphologique. Cette phase correspond à une tentative de réparation du cartilage érodé par les contraintes mécaniques (Mazieres, 1996). Par la suite, les chondrocytes vont dégénérer et nécroser, laissant des zones acellulaires avec destruction de la matrice (Vignon, 1995). Cette destruction de la matrice est aggravée et accélérée par les enzymes de dégradation.

Lors de l'arthrose, il existe un déséquilibre entre les activités d'anabolisme et de catabolisme des chondrocytes, au profit du catabolisme. Les chondrocytes arthrosiques secrètent des enzymes protéolytiques en quantité élevée. Ils sont la source la plus importante d'enzymes protéolytiques responsables du catabolisme de la matrice cartilagineuse. Les chondrocytes arthrosiques sont aussi des producteurs de cytokines pro-inflammatoires, d'endothéline-1, d'oxyde nitrique et de facteurs de croissance qui régulent le métabolisme articulaire en stimulant la dégradation de cartilage.

3.1.2. Matrice extracellulaire

La MEC est principalement constituée d'eau, de fibrilles de collagène et de protéoglycanes. Des glycoprotéines non-collageniques, des lipides et des sels minéraux participent aussi à la structure de la MEC, mais ils s'y trouvent en plus petites quantités.

3.1.2.1. Collagène

Le cartilage se compose principalement de fibres de collagène de type II auxquelles s'associent des fibres de collagène de type IX, XI, VI et X (Eyre, 1991). Le collagène

existe sous forme de fibres et fibrilles dont la densité, l'épaisseur et l'orientation varient avec la profondeur du tissu. Les fibrilles de collagène forment un réseau dense qui donne au tissu cartilagineux une forte résistance.

Le collagène majeur du cartilage articulaire (de type II) est un collagène fibrillaire, constitué de trois chaînes polypeptidiques identiques de type $\alpha 1(\text{II})$ qui confèrent à ce collagène la capacité de résister aux forces de déchirement. Les chaînes sont riches en acides amines de type glycine, proline, hydroxyproline, lysine et hydroxylysine. Chaque chaîne est enroulée autour de son propre axe longitudinal et, entre elles pour former une triple hélice (région hélicoïdale). Le collagène de type II se retrouve principalement dans le cartilage mais il est également présent dans l'humeur vitreuse de l'œil et dans les portions centrales des disques intervertébraux et des ménisques intra-articulaires (Mitrovic et al., 2000).

Le collagène de type IX est composé de trois chaînes polypeptidiques distinctes, $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$, $\alpha 3(\text{IX})$. Il est associé aux fibres de collagène de type II et est spécifique aux tissus cartilagineux. Il joue un rôle important dans la formation et la stabilité mécanique du réseau collagénique du cartilage (Diab et al., 1996).

Le collagène de type XI forme une microfibrille autour de laquelle le collagène de type II peut s'organiser. Il est spécifique au cartilage et est impliqué dans l'organisation du réseau collagénique de celui-ci en contrôlant le diamètre des fibres du collagène de type II (Mitrovic et al., 2000).

Le collagène de type VI a été trouvé à la surface du cartilage et dans l'espace péricellulaire. Il n'est pas spécifique au cartilage puisqu'il est trouvé dans d'autres

tissus. Sa fonction dans le cartilage n'est pas connue, mais il aurait un rôle dans l'adhérence des chondrocytes avec la matrice extracellulaire (Mercelino et al., 1995).

Le collagène de type X est plus court que les collagènes de type II et XI. Il est présent en grande quantité au niveau de la métaphyse et de sites de fracture (Schmid et al., 1990).

D'autres types de collagène ont aussi été identifiés dans le cartilage pathologique ou sous certaines conditions de culture.

3.1.2.2. Agrécanes

Les protéoglycanes sont une classe de macromolécules composites, de poids moléculaire élevé, faites d'une protéine axiale et d'un grand nombre (150 en moyenne) de chaînes linéaires de glycosaminglycanes (GAG). Dans le tissu, ces molécules existent sous forme isolée (protéoglycane monomère) et accolées à un long filament d'acide hyaluronique. Elles se situent à côté des protéines de liaison dans une structure moléculaire énorme, pouvant atteindre plusieurs centaines de millions de Daltons et quelques microns de longueur (agrégat de protéoglycanes, agrécanes)

Les agrécanes sont des protéoglycanes de grande taille (environ 2.5 millions Da), capables de former des agrégats avec l'acide hyaluronique. Ils ont quelques régions fonctionnelles bien définies. Un monomère d'agrécanne est constitué d'une protéine axiale (core protein) de 210-250 kDa où s'attachent des chaînes de sulfate de chondroïtine (100-150 par monomère) et des chaînes de sulfate de kératine (30-60 par monomère). Les agrégats sont formés jusqu'à d'au plus 100 monomères qui sont attachés à une seule chaîne d'acide hyaluronique.

Les fibres de collagènes de la MEC forment un réseau qui contient les molécules d'agrécane. Les agrécane joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du cartilage articulaire. Les concentrations élevées de GAG et d'agrécane permettent à la MEC d'attirer et de retenir les molécules d'eau. Ainsi, la pression osmotique est augmentée et assure au cartilage la capacité de résister aux forces de pression.

Toute atteinte du taux d'agrécane ou de l'organisation du réseau de collagène va à terme aboutir à un déséquilibre biomécanique qui est un facteur de la dégradation et à la pérennisation des lésions du cartilage. Si les perturbations de la fonction matricielle se prolongent avec des contraintes sur les tissus fonctionnels (tension, cisaillement et compression), on peut s'attendre à une perte de cartilage (Pratta MA et al., 2003).

La dégradation accrue des agrécane est considérée comme un événement critique qui se passe à la surface articulaire puis qui progresse vers les zones plus profondes. Cette dégradation des agrécane avec libération de petits fragments apparaît dans les premiers stades de l'arthrose.

L'analyse des fragments d'agrécane retrouvés dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrose a montré l'existence de deux types d'enzymes protéolytiques qui clivent les agrécane : les MMP et les agrécaneases.

3.2. Catabolisme du cartilage articulaire

3.2.1. Collagénases

3.2.1.1. Famille des métalloprotéases

Les métalloprotéases (MMP) sont une famille d'enzymes zinc-dépendantes qui jouent un rôle très important dans la dégradation du cartilage. Leur caractéristique commune est d'agir sur les composants de la matrice extracellulaire, d'où leur nom de matrixine. Les MMP actives sont capables de dégrader une multitude de protéines de la MEC incluant le collagène, les protéoglycanes, la fibronectine et la laminine (Woessner JF 1991). Elles sont soumises à de nombreux processus de régulation et leur activité est réglée par des inhibiteurs spécifiques, les TIMP (tissue inhibitors of metalloprotease) et l' α 2-macroglobuline (Gomez et al., 1997).

Actuellement, plus de 25 MMP ont été identifiées et classées selon la similitude de leur substrat en cinq principaux groupes : les collagénases (MMP-1,-8,-13), les gélatinases (MMP-2,-9), les stromélysines (MMP-3,-10,-11), les MMP de types membranaires (MMP-14,-17,-24,-25) et d'autres MMP (la matrilysine (MMP-7), l'énamélysine (MMP-20), la macrophage métalloélastase (MMP-12) et la MMP-19).

3.2.1.2. Collagénases dans le cartilage

Les MMP sont produites par des cellules des tissus articulaires dont les chondrocytes, les fibroblastes, les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes, neutrophiles). La synthèse des collagénases par les

chondrocytes et les synoviocytes est stimulée par des médiateurs de l'inflammation, comme l'IL-1 et le TNF α (Campbell et al., 1988). L'expression et la synthèse des MMP-1 et MMP-13 est stimulée par l'ET-1 (Roy-Beaudry et al., 2003). Les collagénases, les MMP les plus étudiées dans le cartilage, ainsi que les stromélysines et les gélatinases ont été trouvés en quantité élevée dans les tissus arthrosiques (Pelletier et al., 1997).

Les collagénases sont sécrétées sous forme d'enzymes latentes et, une fois activées, elles clivent principalement le collagène natif, mais aussi les agrécanes et la gélatine. Les collagénases sont retrouvées dans le cartilage humain. La collagénase-1 (MMP-1), la collagénase-2 (MMP-8) et la collagénase-3 (MMP-13) sont considérablement augmentées lors de l'arthrose (Martel-Pelletier et al, 1996; Reboul et al., 1996). La distribution dans le cartilage arthrosique de la collagénase-1 et -3 est très hétérogène, la collagénase-1 se trouve dans la zone superficielle du cartilage tandis que la collagénase-3 se retrouve particulièrement dans la zone intermédiaire et profonde (Moldovan et al, 1997).

La collagénase-1 (MMP-1) est une métalloprotéase qui a une spécificité élevée pour le collagène de type II. La collagénase-3 (MMP-13) clive également le collagène de type II (le collagène majeur du cartilage articulaire), tout en étant 5 fois plus active que la collagénase-1 (Mitchell et al., 1996).

3.2.1.3. Voies de signalisation activées par les cytokines pro-inflammatoires

Dans l'arthrose, le stress mécanique cause la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les chondrocytes, avec la sécrétion subséquente des MMP (Shlopov et al., 1997). Les cytokines IL-1 et TNF- α stimulent les fibroblastes synoviales et les chondrocytes articulaires à produire le MMP-1 et MMP-13 (Firestein et al., 1991; Clark et al., 1993). L'IL-1 et le TNF- α déclenchent une série d'événements de phosphorylation dans la cellule qui facilitent l'induction transcriptionnelle des MMP. Fait intéressant, l'induction du système des MMP implique les mêmes voies de signalisation que la stimulation de la synthèse de collagène.

Récemment, Reunanen et al. (2002) ont démontré que ERK1/2, SAP/JNK et p38MAPK règlent la capacité protéolytique des fibroblastes par la médiation de l'activité des collagénases MMP-1 et MMP-13. Dans les fibroblastes provenant d'un modèle d'arthrite rhumatoïde, l'induction de la MMP-13 par l'IL-1 requière l'activation de JNK (Mengshol et al, 2001). La voie JNK ne semblent pas influencer la production de la MMP-1 (Brauchle et al, 2000). Ainsi, *in vitro*, dans les chondrocytes, l'activation des MAP kinases par le TNF- α induit la MMP-13 (Liacini et al., 2003). Ces études montrent bien que les MAP kinases sont un groupe de protéines important dans l'induction de l'expression des métalloprotéases (Garrington et al., 1999).

Les cytokines pro-inflammatoires figurent parmi les stimuli de la cascade des MAPK. Une fois activées, les MAPK se dirigent vers le noyau où elles vont phosphoryler et activer divers facteurs de transcription (tels que Elk-1, c-Jun, ATF2 et CREB). Les voies de JNK et ERK, très importantes pour la transcription des MMP, phosphorylent

et activent la protéine AP-1 (un membre de la famille c-Jun) qui dimérise avec c-Fos pour induire la transcription des multiples gènes des MMP (Karin et al., 1995). Ainsi, la voie de ERK règle l'activité du facteur de transcription Ets qui coopère avec les protéines AP-1 pour l'induction des multiples promoteurs des MMP. La voie de p38 contribue de manière indirecte à la transcription des MMP, par l'induction de l'expression des protéines AP-1. La p38 phosphoryle le facteur de transcription ATF-2 qui induit le promoteur de c-Jun et la Elk-1, qui à leur tour vont activer le promoteur de c-fos (Davis et al., 2000).

Une autre voie majeure de signalisation induite par les cytokines implique la translocation des membres de la famille du facteur nucléaire kB (NF-kB). Une inhibition du facteur de transcription NF-kB inhibe la production de MMP-13, (Liacini et al, 2003) et son activation entraîne l'expression de MMP-1 et MMP-13 (Mengshol et al., 2000), ce qui montre le rôle important de ce facteur dans la régulation des MMP. Le facteur NF-kB peut aussi induire les MMP-1 et -3 indépendamment de l'activation de ERK $\frac{1}{2}$ et de p38 (Mengshol et al, 2001).

Des études récentes ont démontré que l'ET-1 joue un rôle dans l'induction de la production des MMP. Ainsi, l'ET-1 augmente la production de MMP-2 et MMP-9 dans les cellules de carcinome ovarien (Rosano et al., 2001) et dans les myocytes de porc (Coker et al., 2001). Dans le cancer ovarien, dans le sarcome de Kaposi et les fibroblastes, l'ET-1 cause l'augmentation des niveaux de MMP et ce via le récepteur ETA (Rosano et al., 2001). Notre laboratoire a montré dans les chondrocytes articulaires que l'ET-1 agit sur la régulation de la MMP-1 et de la MMP-13 (Roy-

Beaudry et al., 2003). Cependant les voies de signalisation activées par l'ET-1 n'ont pas été établies.

3.2.2. Agrécanases

Les agrécanases appartiennent à la famille des adamlysines (the ADAM family – A Disintegrin And Metalloprotease). Les enzymes impliquées dans le clivage d'agrécanes font partie de la famille ADAM, mais ce sont des adamlysines avec des motifs thrombospondin (ADAMTS). Les ADAMTS présentes dans le cartilage sont l'agrécanase-1 (ADAMTS-4), l'agrécanase-2 (ADAMTS-5/11) et le METH1 (ADAMTS-1). Elles sont les principaux médiateurs de la dégradation des agrécanases, contribuant à la destruction du cartilage (Vankemmelbeke et al., 2003).

Les ADAMTS contiennent 800 - 1200 aa et chaque ADAMTS est constitué de plusieurs régions: la région pro (prévient l'auto catalyse et l'autodestruction), la région catalytique, la région disintegrin, le premier domaine thrombospondin (TS1; les régions thrombospondin sont essentiels pour l'identification et le clivage d'agrécanes), la région cys-rich, la région espace (aussi nécessaire pour le clivage d'agrécanes) et la deuxième région thrombospondin (TS2) (Mort et Billington, 2001; Arner, 2002). Le site de clivage protéolytique dominant des agrécanases n'est pas le même que celui généré par les métalloprotéases. Les MMP clivent surtout la liaison Asn341-Phe342, tandis que les ADAMTS 4 et 5 clivent premièrement la liaison Glu373-Ala374 (Sandy et al., 1991) (mais aussi les liaisons Glu1480-Gly1481, Glu1667-Gly1668, Glu1771-Ala1772 et Glu1871-Leu1872) (Tortorella MD et al., 2000) et l'ADAMTS-1 clive les liaisons Glu1480-Gly1481 et Glu1871-Leu1872 de l'agrécanes. Les ADAMTS 1 et 4

clivent ensemble la liaison Asn341-Phe342 ce qui suggère que ces deux ADAMTS peuvent aussi couper au niveau du site de clivage des MMP. Donc, dans le cartilage arthrosique, les agrécanases sont les plus importants facteurs qui clivent les agrécane.

4. VOIES DE SIGNALISATION DE L'ENDOTHÉLINE-1

L'endothéline-1 est impliquée dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. Cette diversité s'explique par l'existence de récepteurs d'ET-1 dans plusieurs tissus et par l'activation des différentes voies de signalisation. L'interaction de l'endothéline-1 avec ses récepteurs active plusieurs voies de signalisation intracellulaire dont l'hydrolyse de la phospholipase C et de la phospholipase D, l'augmentation de la concentration du calcium cytosolique libre, la modulation de la concentration des ions H^+ , K^+ et Cl^- , la stimulation de la phospholipase A2, l'activation de la protéine kinase C, des MAP kinase, de la PI3 kinase et des tyrosines kinases et la génération du AMPc et du GMPc (Webb and Meek, 1997)

4.1. Récepteurs de l'endothéline-1

Les actions physiologiques dues à l'endothéline-1 sont médiées par l'interaction de l'ET-1 avec des récepteurs spécifiques situés à la surface des tissus cibles. Trois types de récepteurs ont été clonés et séquencés : ET_A (Arai H et al., 1990), ET_B (Sakurai T et al., 1990) et ET_C (Karne S et al., 1993). Les trois types de récepteurs montrent une structure à 7 domaines transmembranaires avec une partie $-NH_2$ terminale extracellulaire et une partie $-COOH$ terminale intracellulaire.

Les récepteurs ET_A , ET_B et ET_C appartiennent à la famille RCPG (récepteurs couplés aux protéines G) qui est la plus grande famille de récepteurs cellulaires de surface. Ce sont des récepteurs transmembranaires de type rhodopsine (Birbaumer L et al., 1990).

Ils activent une variété de petites protéines G hétérométriques impliquées dans l'échange GDP/GTP, donnant des réponses différentes en fonction de type cellulaire (Sugden PH, 2003). Le couplage entre le récepteur et la protéine G active une molécule effectrice, conduisant à une cascade de messagers secondaires.

Les chondrocytes articulaires expriment les récepteurs ET_A et ET_B , avec une prédominance du récepteur ET_A (Khatib et al., 1998). De plus, le récepteur ET_A est surexprimé dans les chondrocytes des animaux âgées (Messai et al, 2001).

Le développement d'antagonistes des récepteurs d'endothéline a été un avancement majeur dans le domaine relié à l'ET. Plusieurs antagonistes ont été développés et utilisés comme outils pharmacologiques, les principales molécules sont notées dans le tableau I. Il existe des antagonistes sélectifs d'un sous-type de récepteur ou non sélectif.

Les antagonistes du récepteur ET_A , particulièrement, font partie de très nombreuses recherches.

Tableau I - Antagonistes des récepteurs de l'endothéline

Sélectivité		
ET _A	ET _B	mixte (ET _A + ET _B)
A-127722	A-192621	A-186086
A-147627 (Atrasentan)	BQ-788	RO 47-0203 (Bosentan)
A-216546	IRL 1038	RO 61-0612 (Tezosentan)
BQ-123	RES-710-1	PD 142893
BQ-485	RO 46-8443	PD 145065
BQ-610		TAK-004
FR 139317		SB-209670 (Enrasentan)
Lu-135252 (Darusentan)		SB-217242
PD 151, 242		
PD 156, 707		
TBC-11251 (Sitaxsentan)		

4.2. Voie de phospholipase C et flux du calcium

Les phospholipases font partie d'une famille d'enzymes impliquées dans la formation des messagers secondaires. La famille des phospholipases C (PLC) comprend trois classes majeures, chacune avec ses isoformes: les PLC- β (β 1- β 4), les PLC- γ (γ 1- γ 3) et les PLC- δ (δ 1- δ 2) (Fisher SK, 1995). Les PLC- β sont régulées par les RCPG (Rhee and Choi, 1992), alors que les PLC- γ sont régulées par les récepteurs des facteurs de croissance (Cockcroft and Thoma, 1992).

Une des premières voies de signalisation activées par l'ET est la voie de la phospholipase C. Suite à l'interaction de l'ET avec son récepteur, la protéine G active

les PLC- β qui provoque le clivage du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG) (Alexander et al., 1985). L'IP₃ se lie à des récepteurs-canaux spécifiques sur le réticulum sarcoplasmique pour libérer le Ca²⁺ des stocks intracellulaires (Hokin et al., 1985) et le DAG active la protéine kinase C (Griendling et al., 1989).

L'ET-1 augmente le calcium intracellulaire dans les chondrocytes de lapins (Kinoshita et al., 1995). Le processus par lequel l'ET induit la signalisation du Ca²⁺ est complexe. L'ET augmente le Ca²⁺ intracellulaire par deux mécanismes interconnectés : via l'IP₃ et en activant les multiples types de canaux de Ca²⁺.

4.3. Protéine kinase C

Les protéines kinases C sont divisées en trois familles : les PKC classiques comme la PKC- α qui sont dépendantes du DAG et du Ca²⁺ pour leur activation, les PKC nouvelles, dépendantes seulement du DAG et les PKC atypiques qui sont indépendantes du DAG et du Ca²⁺ (Newton AC, 2001). L'ET active la protéine kinase C via la voie phospholipase C/DAG. Une des cibles de la PKC est l'activation des cascades des MAP kinases et de PI3 kinase. L'activation des PKC est impliquée dans plusieurs processus, tels que la différenciation, la croissance et la régulation de l'expression génétique.

4.4. Voie de phospholipase A2

Des études sur la voie de synthèse des dérivés de l'acide arachidonique et de la phospholipase A2 (Ferraira et al, 1989) ont aussi montré l'implication de l'ET-1 dans l'inflammation. L'ET active la phospholipase A2 (PLA2) dans plusieurs tissus, en conduisant à la libération d'acide arachidonique. Par la suite, celui-ci est métabolisé en prostaglandines, tromboxanes et leucotriènes. Les deux récepteurs, ET_A et ET_B, sont impliquées dans la stimulation de la PLA2 (Resnik et al., 1989).

L'activation de la phospholipase A2 par l'ET-1 joue un rôle important dans l'inflammation et la vasoconstriction (Schramek et al., 1994a).

4.5. Voie de phospholipase D

La phospholipase D (PLD) est activée par l'ET et hydrolyse les phospholipides membranaires, en produisant l'acide phosphatidique, qui est hydrolysé à son tour en DAG (Shukla et al, 1991). L'activation de la PLD par l'ET semble avoir une liaison avec l'activation des protéines tyrosines kinases (PTK). Plusieurs protéines tyrosines kinases sont activées par l'ET-1, parmi lesquelles le c-Src (Bisotto et al., 2001) et le Pyk2 (Kodama et al., 2002). Les messagers secondaires comme la choline et l'acide phosphatidique participent dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires et jouent un rôle important dans la transmission de signal par la voie de l'ET.

4.6. Voie de l'AMPc et protéine kinase A

Les voies de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et du GMPc (guanosine monophosphate cyclique) participent à la transmission de signal stimulé par l'ET (Sokolovsky et al., 1994; Shraga-Levine et al., 1994). L'effet de l'ET sur la production de l'AMPc est fonction du type de récepteur. Via le récepteur ETA, l'ET-1 stimule la formation de AMPc, tandis que via le récepteur ETB, la formation de l'AMPc est inhibée. (Aramori and Nakanishi, 1992).

La protéine kinase A (PKA) (protéine kinase dépendante de l'AMPc) est le principal médiateur de l'AMPc chez les mammifères (Scott, 1991). L'enzyme PKA est constituée de deux dimères: l'un composé de deux sous-unités régulatrices et l'autre de deux sous-unités catalytiques. Les sous-unités régulatrices sont responsables de deux isoformes de PKA : PKA de type I et PKA de type II (McKnight et al., 1988).

Deux molécules d'AMPc se lient à chaque sous-unité régulatrice, et par la suite les deux sous-unités catalytiques vont être libérées. Les sous-unités catalytiques actives vont phosphoryler plusieurs substrats protéiques (Tasken et al., 1993).

La PKA activée par l'AMPc est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. L'activation de PKA est requise pour la stimulation d'iNOS et en conséquence pour la production de NO dans des cellules telles que les cellules vasculaires lisses (Koide et al., 1993), les myocytes cardiaques (Oddis et al., 1996) et les macrophages humains (Jovanovic et al., 1998). Dans les chondrocytes ostéoarthritiques, la PKA est impliquée dans la production de NO induite par les cytokines pro-inflammatoires (Blanco et al., 1995).

4.7. Voie du GMPc et de l'oxyde nitrique

Le NO est un radical libre qui est impliqué dans la régulation d'un vaste nombre de processus biologiques : la neurotransmission, la nociception, la coagulation, la réponse immunitaire, l'inflammation, le développement du poumon, la motilité intestinale. C'est un facteur clé dans la signalisation intracellulaire. La principale fonction physiologique du NO est dans les vaisseaux sanguins où il produit une vasodilatation et où il baisse la pression sanguine (Moncada et al., 1991).

Des concentrations élevées de NO ont été trouvées dans le liquide synovial, suggérant que le NO joue un rôle dans les maladies articulaires inflammatoires (Farrell et al., 1992). L'oxyde nitrique est connu comme un régulateur de plusieurs fonctions chondrocytaires. De plus, il est produit de manière spontanée dans les explants de cartilage arthrosique (Amin et al., 1997). Les chondrocytes articulaires produisent l'oxyde nitrique en grandes quantités (Rediske et al., 1994). Ce NO est un agent catabolique du cartilage qui inhibe la synthèse de l'ADN (Khatib et al., 1997c) et la synthèse de la matrice extracellulaire (Gassner et al., 2000) et qui induit la dégradation de la matrice via l'augmentation de la synthèse des MMP (Murrell et al., 1995). Murrell et al., (1995) ont montré *in vitro* que le NO peut induire la synthèse et l'activité des MMP dans les chondrocytes et le cartilage. Ainsi, le NO peut inhiber la synthèse de collagène et des protéoglycanes dans les chondrocytes (Hauselmann et al., 1994, Studer et al., 1999). Dans les articulations arthritiques, le NO est aussi impliqué indirectement dans l'induction de la production des cytokines pro-inflammatoires par la réduction de

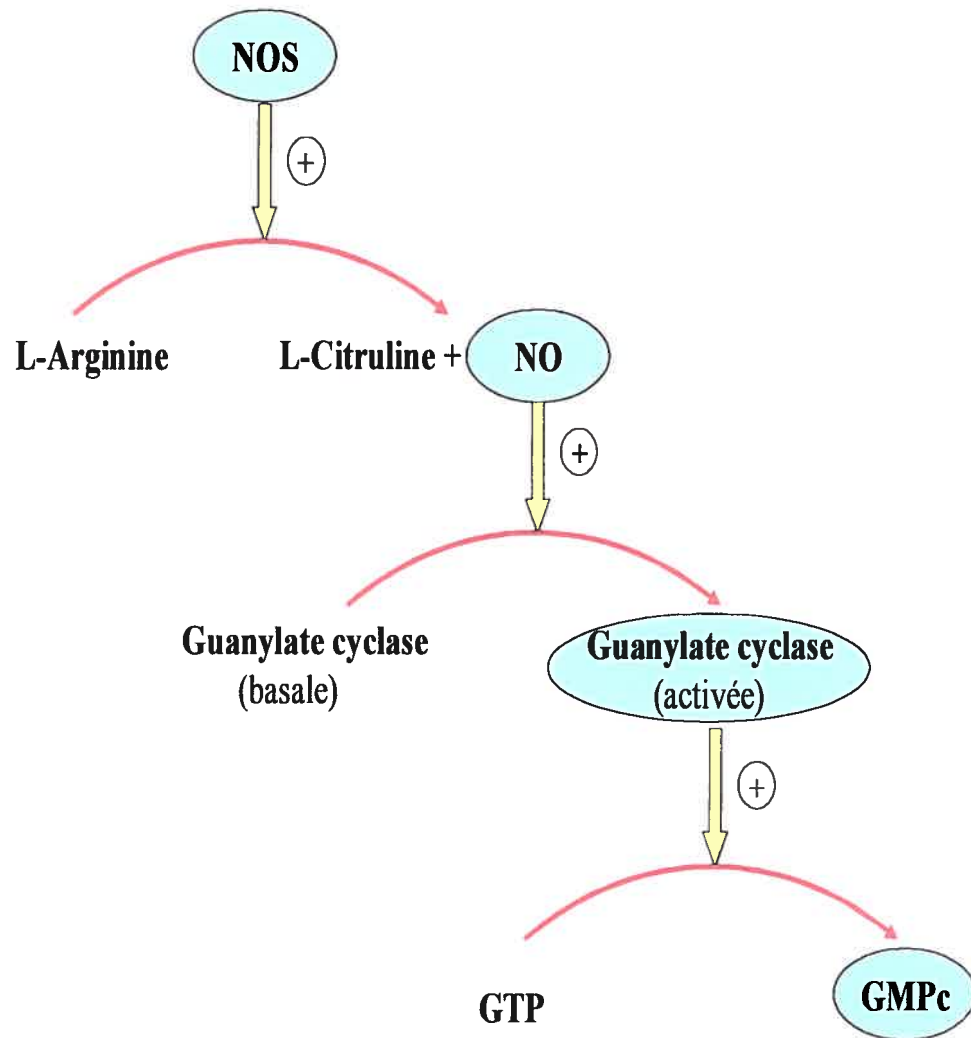
la synthèse de l'antagoniste de récepteur de IL-1 (IL-1Ra) (Pelletier et al., 1996) et par l'augmentation de la production de TNF- α par les cellules synoviales (McInnes et al., 1996).

Un excès de NO a été démontré comme toxique pour les cellules, induisant l'apoptose et la mort cellulaire dans les chondrocytes articulaires (Aigner et al., 2002), tandis que des niveaux physiologiques de ce médiateur sont nécessaires pour le fonctionnement normal du métabolisme cellulaire.

La balance ET/NO est importante dans le métabolisme des chondrocytes articulaires. L'ET-1 stimule la production de NO dans les chondrocytes articulaires de souris (Khatib et al., 1997c), tandis que le NO inhibe la production de l'ET-1 (Khatib et al., 1999). La production de NO induite par l'ET-1 est liée à l'activation des récepteurs ETB (Hirata et al., 1993). L'induction de la production de NO active par la suite la guanylate cyclase soluble (GCs), induisant la production du GMP cyclique (Feelisch and Noack, 1987). La guanylate cyclase est une enzyme qui catalyse la conversion de guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Le GMP cyclique fonctionne comme un messenger secondaire dans plusieurs cellules humaines. Il est nécessaire pour la synthèse des protéines et ce mécanisme est bloqué quand le GMPc est inhibé (Khatib et al., 2002). La production de GMPc dépendante de NO peut être inhibée par l'inhibiteur LY83583. (Mulsch et al., 1998). Dans les chondrocytes articulaires, l'inhibition de la synthèse d'ADN par NO est facilitée par une augmentation de la GMPc cellulaire (Khatib et al., 1997c).

L'oxyde nitrique est produit au cours de la transformation de la L-arginine en L-citruline par l'enzyme NO synthase (NOS) (Marletta MA, 1993).

Figure 3 - L'induction de la production de GMPc par l'NOS synthase



Les enzymes NOS occupent un rôle central dans le contrôle du NO. Il existe trois isoformes de NOS. L'isoforme neuronale (nNOS) activée par le Ca^{2+} est présente dans le système nerveux central. La deuxième forme NOS endothéliale (eNOS) qui est aussi dépendante du Ca^{2+} est principalement exprimée dans l'endothélium, mais aussi dans les myocytes cardiaques, les cellules rénales mésangiales, les ostéoblastes et les ostéoclastes. La troisième forme inductible (iNOS) est exprimée dans les hépatocytes, les macrophages, les neutrophiles, les fibroblastes, les chondrocytes, les cellules endothéliales, etc. L'iNOS est dépendante de son niveau d'expression et non du niveau de calcium intracellulaire.

La NOS inductible joue un rôle important dans la dégradation articulaire. Les chondrocytes ont été les deuxièmes types cellulaires où l'iNOS a été clonée et caractérisée (Charles et al., 1993) peu après sa découverte dans les hépatocytes (Geller et al., 1993). Dans les articulations arthrosiques, l'iNOS est également exprimée dans la membrane synoviale (Sakurai et al., 1995). Par la technique d'immunohistochimie, une expression d'iNOS plus élevée dans les chondrocytes par rapport à celle trouvée dans les synoviocytes provenant des patients arthrosiques a été mise en évidence, suggérant que les chondrocytes sont la source majeure de NO dans les articulations arthrosiques (Melchiorri et al., 1998). L'iNOS est induite par la lipopolysaccharide bactérienne (LPS) et/ou des cytokines synthétisées en réponse au LPS, surtout l'interféron γ . Le TNF- α et l'IL-1 β ne sont pas efficaces dans l'induction de l'iNOS, mais ils fonctionnent en synergie avec l'interféron γ . L'induction de l'iNOS est inhibée par les glucocorticoïdes et par plusieurs cytokines, comme le TGF- β .

Les NOS peuvent être inhibées par les analogues de la L-arginine, tels que L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester) et L-NMMA (N-monomethyl-L-arginine). De plus, le L-NIL (N-iminoethyl-L-lysine) est connu comme un inhibiteur spécifique d'iNOS. *In vivo*, dans des modèles expérimentaux d'arthrose chez l'animal, l'inhibition sélective de l'iNOS synthase par le L-NIL protège l'articulation arthrosique (Pelletier et al., 1998).

4.8. Voie des MAP kinases

Les MAP kinases (mitogen-activated proteins kinases) font partie d'une famille de sérine/thréonine protéines kinases et figurent parmi les systèmes de transduction du signal les plus étudiés. Les voies des MAP kinases interviennent dans de nombreux phénomènes physiologiques cellulaires comme la croissance, le développement, la différenciation, la division, la motilité, l'inflammation et l'apoptose. Dans les chondrocytes arthrosiques humains, les voies des MAP kinases ont une grande importance (Liacini et al., 2003).

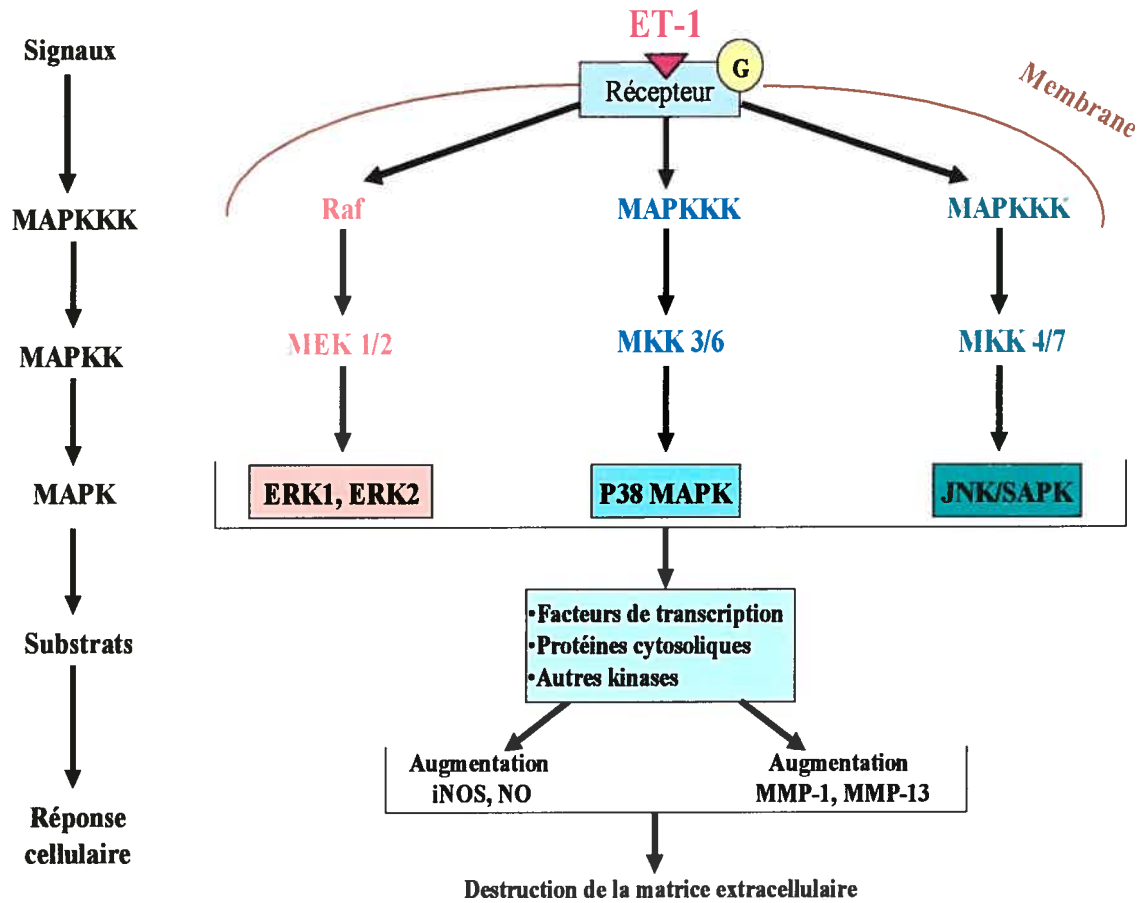
Les MAP kinases fonctionnent en cascades, activées par de multiples signaux dont des facteurs de croissance, des mitogènes, le stress, les hormones, les chocs thermiques, la lumière ultraviolette et des cytokines (Widmann et al., 1999), qui exercent leurs effets par l'intermédiaire de diverses familles de récepteurs comme les RCPG, les récepteurs de tyrosine kinases, les récepteurs de cytokine et les récepteurs de sérine-thréonine kinase (Kyriakis and Avruch, 2001). Elles sont constituées en modules de signalisation qui transmettent des signaux extracellulaires de la membrane vers le noyau. Les

modules sont constitués de trois protéines kinases qui s'activent mutuellement: les MAP kinase kinase kinases (MAPKKK) activent les MAP kinase kinases (MAPKK) qui ensuite activent les MAP kinases (MAPK). Les MAPK phosphorylées activent des molécules cibles très variées ce qui provoque des réponses cellulaires. Les kinases sont activées par la double phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine en un motif TXY (où le X est Glu, Pro et Gly pour les ERK, JNK et p38) (Pearson G et al., 2001). Cinq voies de signalisation intracellulaire ont été jusqu'à présent identifiées chez les mammifères, les plus importantes étant les cascades ERK1/2 (p44/42), SAP/JNK et p38 MAP kinase.

Tableau II - La terminologie des MAPK

Le motif de phosphorylation	La terminologie commune	Autres terminologies
Thr-Glu-Tyr	ERK1	p44-MAPK
Thr-Glu-Tyr	ERK2	p42-MAPK
Thr-Pro-Tyr	JNK	JNK2, SAPK α
Thr-Pro-Tyr	JNK	JNK3, SAPK β
Thr-Pro-Tyr	JNK	JNK1, SAPK γ
Thr-Gly-Tyr	p38-MAPK	p38-MAPK α , p38
Thr-Gly-Tyr	p38-MAPK β	
Thr-Gly-Tyr	p38-MAPK γ	ERK6
Thr-Gly-Tyr	p38-MAPK δ	
Thr-Gly-Tyr	Big MAPK1	ERK5, BMK1

Figure 4 - L'induction de la cascade des MAPK par l'ET-1



4.8.1. La voie ERK1/2

Les ERK sont les MAPK les plus connues et les mieux caractérisées. Elles sont représentées par deux isoformes : ERK-1 et ERK-2, identifiées aussi selon leurs poids moléculaires respectivement p44 MAPK et p42 MAPK. L'ERK-1 a été la première MAP kinase clonée (Boulton et al., 1990). Actuellement, il est impossible de faire la distinction entre ces deux isoformes parce que la spécificité d'action de chacune d'entre elle ne peut pas être déterminée.

En général, la voie des ERK est activée par des mitogènes et des facteurs de croissance. Les protéines A-Raf, B-Raf et c-Raf (connues également sous le nom de Raf-1) et les MAPKKK sont activés par les protéines Ras (une famille de petites protéines G), qui sont les initiateurs de la cascade ERK1/2. Les Raf provoquent l'activation de MEK1/2, une MAPKK qui provoque à son tour l'activation des ERK1 et ERK2 (Avruch et al., 1994). L'activation des ERK1/2 entraîne la phosphorylation et la modulation de nombreuses protéines de signalisation, comme les protéines kinases (MSK1/2, MNK1/2), les protéines cytosoliques (phospholipase A) et les facteurs de transcription (Elk-1, SAP1, ATF-2, CREB) (Sugden PH, 2003).

La voie ERK1/2 peut être bloquée au niveau de son activateur immédiat, la MEK1/2, par le PD98059 (Dudley et al., 1995), ou par le U0126 (Favata et al., 1998). La voie ERK1/2 peut aussi être bloquer par l'oligonucleotide ERK1/2 phosphorothioate antisens (Robinson et al., 1996).

Des expériences faites dans les neutrophiles avec PD98059 ont révélé que l'ET-1 active la ERK via la voie Ras/Raf-1/MEK (Fernandez-Patron et al, 2002). L'ET-1 active

également la cascade ERK1/2 dans les cellules myométriales de rat (Robin et al., 2002).

4.8.2. La voie de p38 MAP kinase

Quatre isoformes de p38 MAPkinase ont été identifiées : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . La p38 α kinase est la première isoforme qui a été identifiée (Han et al., 1994). C'est la plus importante protéine kinase impliquée dans la réponse inflammatoire (Kumar S. et al., 2003).

Les p38 MAPK sont activées par des MAPKK comme MAP2K6 (aussi connu sous le nom MKK6) et MAP2K3 (MKK3) (Raugeaud et al., 1996). Ces MAPKK sont activées par plusieurs MAPKKK qui sont elles-mêmes activées par plusieurs stimuli dont le stress, le choc thermique, la lumière ultraviolette, les cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance (Adams JL et al., 2001).

Récemment, un nouveau mécanisme d'activation de p38 MAPK, indépendant des MAPKK, qui implique le TAB1 (transforming growth factor- β -activated protein kinase 1-binding protein 1) a été décrit (Tanno et al., 2003).

La P38 MAPK activée phosphoryle quelques substrats comme les facteurs de transcription (MEF2, ATF-2, CHOP, SAP-1A, Elk-1), d'autres kinases (MAPKAP K2/3, PRAK, RSK-B, MSK1, MNK1/2) et des protéines cytosoliques (stathmine) (Stanton et al., 2003).

Dans la littérature, l'activation de la p38 MAPK par l'ET-1 a été décrite dans les myocytes cardiaques produisant le facteur natriurétique de type B (Pikkarainen et al, 2003) et dans les ostéoblastes qui expriment spécifiquement les ARN messagers de la

prostaglandine H synthétase de type 2 (Windischhofer et al., 2002). De même, l'activation de la p38 MAPK par l'ET-1 a été décrite dans les fibroblastes cardiaques (Cheng et al., 2003) et dans l'aorte de rat (Kwon et al., 2003). Dans les chondrocytes articulaires, l'activation des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α et l'induction de la production de la MMP-1 et de la MMP-13 par l'IL- β exige aussi l'activation de la p38 MAPK (Mengshol et al., 2000).

Les inhibiteurs les plus connus de la voie de p38 sont SB202190 et SB203580 (Badger et al., 1996).

4.8.3. La voie de SAPK/JNK

Les protéines c-Jun-N-terminal kinases (JNK) sont fortement activées par le stress cellulaire et par conséquent, ils ont pris le nom de SAP kinases (stress activated protein kinases). D'autres facteurs activateurs des SAP/JNK sont les cytokines pro-inflammatoires (en particulier la famille du TNF) et des peptides vasoactifs (endothéline, angiotensine II) (Kyriakis and Avruch, 1996). Les MAPKKK activent les MKK4/7, des MAPKK, qui activent les SAP/JNK. Il y a trois isoformes de SAP/JNK : JNK2 (SAPK α), JNK3 (SAPK β) et JNK1 (SAPK γ). JNK1 et JNK2 sont exprimées dans plusieurs tissus, tandis que JNK3 n'est exprimée que dans le cerveau, les testicules et le cœur (Davis, 2000). Dans les fibroblastes cardiaques, il a été démontré que l'ET active la voie de p38 MAPK et celle de la SAP/JNK (Cheng et al., 2003).

Les inhibiteurs de la voie SAP/JNK sont SB203580 qui inhibe aussi la voie de p38 MAPK, SP600125 (Han et al., 2001) et le curcumin (Chen et al., 1998).

4.9. La voie de PI3 kinase

La PI3K fait partie d'une famille de kinases lipidiques qui contient trois sous-familles : les classes I, II et III. Elles sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la résistance à l'apoptose, la motilité, la prolifération, la différenciation cellulaire et le métabolisme des hydrates de carbone (Vanhaesebroek et al., 1997). L'activation des PI3 kinases constitue une voie de signalisation majeure au niveau cellulaire.

Selon certains chercheurs, l'activation de la PI3K se fait en amont de l'activation de Ras, suggérant un rôle de cette kinase dans l'activation de la voie ERK1/2 (Yano et al., 1995). D'autres auteurs ont suggéré que la stimulation par les RCPG de la voie ERK1/2 dépendante de Ras implique une régulation intermédiaire par la PI3K (Lopez-Hasaca et al., 1997). La PI3K va générer les lipides PtdIns(3,4,5)P3 et PI-3,4-P2, qui vont se lier au domaine PH de l'Akt en l'activant. L'Akt, effecteur primaire de la PI3K, est une sérine/thréonine kinase connue aussi sous le nom de protéine kinase B (PKB) (Gingras et al., 1998) qui active la kinase FRAP/mTOR qui va alors phosphoryler et activer la p70 S6 kinase (Brown et al., 1995).

L'activation de la PI3K peut être bloquée par deux inhibiteurs spécifiques : Wortmannine (Ui et al., 1995) et LY294002 (Sanchez-Margalet et al., 1994).

5. L' APOPTOSE

L'apoptose est un processus d'élimination cellulaire programmée, permettant d'assurer le renouvellement cellulaire. La mort cellulaire apoptotique intervient ainsi dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire de façon opposée à la mitose. En effet, les mitoses permettent la réplication cellulaire, tandis que l'apoptose conduit à la disparition des cellules. Les facteurs déclanchant l'apoptose sont multiples. L'apoptose peut être initiée par la stimulation de nombreux récepteurs membranaires cellulaires comme le récepteur T, la protéine Fas (appelée aussi APO- 1 ou CD 95), les récepteurs du transforming growth factor-Beta (TGF- β) (facteur d'inhibition de la croissance cellulaire) et du tumor necrosis factor (TNF). La protéine Fas joue un rôle essentiel. Le récepteur Fas fait partie des récepteurs de la mort cellulaire. Il joue un rôle central dans la modulation de la réponse immunitaire. Une fois engagé, le récepteur Fas recrute différentes protéines ce qui conduit à l'activation en cascade des caspases.

L'apoptose dépend de la capacité de l'organisme à produire de nouvelles cellules, mais aussi de la capacité des cellules à mourir quand elles sont endommagées, inutiles ou dysfonctionnelles. Cette capacité des cellules à mourir quand c'est nécessaire s'appelle l'apoptose ou mort cellulaire programmée.

L'apoptose est présente le plus souvent au cours du développement embryonnaire et du remodelage physiologique post-natal, lors du maintien de l'homéostasie des tissus normaux, durant le vieillissement, etc. L'apoptose aberrante joue un rôle important dans diverses pathologies tels que les cancers, le SIDA, certaines conditions auto-immunes, certaines maladies neurodégénératives, les lésions neurologiques ou

cardiaques, les hépatites virales (Hetts, 1998). De nombreuses molécules sont impliquées dans la régulation de l'apoptose, telles que les membres de la famille Bcl-2, les proto-oncogènes Myc, Fos et Jun, la tyrosine kinase p59Fyn et les protéines de choc thermique (hsp27, hsp60 et hsp70). Ces facteurs peuvent induire l'apoptose ou au contraire l'inhiber et favoriser alors la croissance cellulaire (proto-oncogènes). La famille des gènes Bcl-2 est constituée de six membres différents dont Bcl-2 et Bcl-x qui bloquent l'apoptose, alors que Bax l'active. Le gène Bcl-2 constitue un régulateur puissant de l'apoptose tant en situation physiologique que pathologique. L'expression des gènes ICE (Interleukin-1 converting enzymes) (six gènes identifiés) est elle-même contrôlée par la famille des gènes Bcl-2.

La mort cellulaire peut se produire par deux mécanismes, la nécrose et l'apoptose. Il est important de faire la distinction entre la nécrose et l'apoptose. La nécrose est une mort cellulaire accidentelle caractérisée par des changements irréversibles au niveau du noyau et du cytoplasme. Elle survient lorsque les cellules sont exposées à de sérieuses agressions physiques et chimiques.

Tableau III – Comparaison entre l'apoptose et la nécrose

Apoptose	Nécrose
Diminution du volume cellulaire	Gonflement de la cellule
Déformation de la membrane	Perte de l'intégrité de la membrane
Peu de gonflement de la mitochondrie	Gonflement de la mitochondrie
Dégradation de l'ADN	Dégradation aléatoire de l'ADN
Se termine avec la fragmentation de la cellule	Se termine avec la dégradation totale de la cellule

L'apoptose est constitué d'un ensemble de processus de digestion interne qui affectent le cytoplasme puis le noyau. Au début, la cellule se détache de ses cellules voisines et son volume diminue. La membrane cellulaire se déforme et le corps cellulaire s'atrophie. Le noyau se condense, l'ADN est fractionné en grands fragments par les endonucléases (Kuan et Passaro, 1998). A la fin du processus apoptotique, la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui sont reconnus et phagocytés rapidement par les macrophages (Dietrich, 1997).

L'apoptose est un processus complexe qui implique plusieurs voies de signalisation, les plus importantes étant : la voie associée aux récepteurs de mort cellulaire, l'activation des caspases, la voie mitochondriale et la fragmentation internucléosomale de l'ADN.

5.1. Apoptose dans le cartilage articulaire

Plusieurs études ont examiné l'apoptose dans le cartilage arthrosique et ont mis en évidence une augmentation de l'apoptose lors de l'arthrose. Ainsi, une augmentation de l'apoptose chondrocytaire en relation avec l'âge a été démontrée (Adams and Horton, 1998). Au cours de l'arthrose, la mort des chondrocytes est corrélée à l'âge et à la sévérité de l'arthrose. Dans le cartilage arthrosique âgé, l'existence d'une hypocellularité et d'une incidence des dépôts anormaux de cristaux de calcium >40% ont été montrés (Ohira and Ishikawa, 1987).

La microscopie électronique a révélé dans le cartilage humain arthrosique des détails nucléaires et cytoplasmiques qui concordent avec l'apoptose cellulaire (Blanco et al., 1998). Les cellules positives mises en évidence par la technique du TUNEL sont plus

fréquentes dans les lésions articulaires en comparaison avec les régions non-lésionnelles (Kim et al., 2000). Dans les zones de cartilage qui contiennent des cellules positives, une perte des protéoglycanes a été démontrée (Hashimoto et al., 1998a). Comme le cartilage articulaire n'est pas vascularisé, les cellules mortes ne sont pas enlevées et restent dans les lacunes où elles vont se désintégrer et vont libérer leur contenu. Cette désintégration des chondrocytes conduit à la formation des corps apoptotiques qui vont contribuer à la minéralisation et à la dégradation de la matrice extracellulaire (Hashimoto et al., 1998b), suggérant le rôle de la mort cellulaire dans la pathogenèse de l'arthrose. Un modèle d'arthrose expérimentale chez le lapin a montré que la mort des chondrocytes est corrélée à la dégradation matricielle et à la production de NO (Hashimoto et al., 1998c).

5.2. Régulateurs de l'apoptose

Dans les chondrocytes, le processus apoptotique est médié surtout par les constituants de la matrice extracellulaire, les agressions mécaniques, l'oxyde nitrique, les récepteurs de la mort cellulaire, la mitochondrie, le p53 et le c-myc.

5.2.1. Les composants de la matrice extracellulaire

La survie des chondrocytes est dépendante de leur adhérence à la matrice extracellulaire (Shakibaei et al., 1999). La perte de certains composants de la MEC peut entraîner la mort des chondrocytes. Dans le cartilage de souris, une diminution de la densité cellulaire est associée avec l'apparition de l'apoptose (Yang et al., 1997). De

plus, l'augmentation des signaux TUNEL et la dégradation de l'ADN ont été observées dans le cartilage du genou, soutenant l'hypothèse que le collagène de type II est important pour la survie des chondrocytes *in vivo*.

La mort des chondrocytes peut être prévenue par le collagène et est associée à l'agrégation cellulaire dépendante de l'intégrine $\beta 1$ (Cao et al., 1999). Chez la souris, l'inactivation du gène de l'intégrine $\alpha 1$ a été associée à une dégradation du collagène, une cellularité diminuée et des cellules apoptotique plus fréquentes (Michihisa et al., 2003). La survie des chondrocytes est régulée par l'interaction des intégrines (des récepteurs de collagène qui sont exprimés dans les chondrocytes) avec les composants de la MEC.

5.2.2. Les agressions mécaniques

Les stimuli mécaniques sont des régulateurs importants de la fonction des chondrocytes et ces stimuli peuvent également induire l'apoptose chondrocytaire (Repo et al., 1977). Dans les modèles animaux, et aussi dans le cartilage humain, les forces compressives causent la mort des chondrocytes. Des cellules positives par la technique de TUNEL peuvent être détectées immédiatement après ses traitements. Des études sur l'articulation ont rapporté l'existence d'une corrélation linéaire entre l'impact du stress mécanique et le pourcentage des chondrocytes morts (Jeffrey et al., 1995).

5.2.3. L'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique est connu comme un régulateur de plusieurs fonctions chondrocytaires et sa production est corrélée avec l'induction de la mort des chondrocytes. Premièrement, des concentrations élevées de donneurs de NO de type nitroprussiate de sodium induisent l'apoptose dans les chondrocytes humaines en culture (Blanco et al., 1995). Le nitroprussiate de sodium augmente l'activité de caspase-3 d'environ 2.5 fois dans les chondrocytes humaines (Notoya et al., 2000). Deuxièmement, un excès de NO est toxique pour les cellules, induisant l'apoptose et la mort cellulaire dans les chondrocytes articulaires (Aigner et al., 2002). Des concentrations élevées de NO sont mortelles pour les molécules biologiques, car le NO produit le peroxy-nitrite et les radicaux d'hydroxyle qui sont cytotoxiques, car il induit la peroxydation des lipides et peut détruire les molécules comme l'ADN. L'effet pro-apoptotique du NO peut être bloqué par des espèces réactives d'oxygène (Blanco et al., 1995).

5.2.4. Les récepteurs de la mort cellulaire

Les membres de la famille de récepteurs au TNF sont des récepteurs transmembranaires qui contiennent des domaines de mort et qui activent des voies de signalisation de l'apoptose. Le Fas (CD95) est un membre de cette famille de récepteurs de mort cellulaire. Le ligand du Fas (FasL, CD95L) est une cytokine qui fait partie de la famille du TNF.

Le ligand Fas est exprimé sur la surface des chondrocytes en culture (Hashimoto et al., 1997). L'expression de Fas a été démontrée dans le cartilage normal et arthrosique

(Kim et al., 2000). Le système Fas/FasL n'est pas un inducteur très puissant de l'apoptose chondrocytaire, il induit une apoptose limitée, mais il peut quand même déclencher l'apoptose dans les zones du cartilage où la matrice est dégradée ou il peut intensifier la mort des chondrocytes en combinaison avec d'autres facteurs promoteurs.

5.2.5. La mitochondrie

La voie mitochondriale est une voie majeure de signalisation dans l'apoptose. Pendant l'apoptose, la perméabilité de la membrane mitochondriale est altérée et des produits apoptotiques comme le cytochrome c et l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) sont libérés. Dans le cartilage arthrosique de souris ainsi que dans l'arthrose humaine il a été démontré que la mitochondrie peut contribuer à la mort des chondrocytes (Kouri-Flores et al., 2002).

5.3. Inhibiteurs de l'apoptose chondrocytaire

On connaît trois groupes d'inhibiteurs de l'apoptose : les membres de la famille Bcl-2, les protéines d'origine virale (CrmA, p35, FLIP et IAP) et les peptides synthétiques (z-VAD-fmk, YVAD-fmk, Ac-DEVD-fmk).

5.3.1. La famille des protéines Bcl-2

La famille des protéines Bcl-2 exerce un contrôle du processus apoptotique. Cette famille régule les pores de la membrane mitochondriale qui libère le cytochrome c et

d'autres facteurs apoptogéniques (Kuan et Passaro, 1998). Les membres de cette famille peuvent être divisés en deux groupes: les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-2, Bcl-1, Mcl-1 et A1) et les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid, Bik, Bcl-xS) (Kelekar et al., 1997).

Le ratio entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques semble déterminer le destin des cellules (Oltvai et al., 1993). Un excès de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 va permettre aux cellules de survivre, tandis qu'un excès de protéines pro-apoptotiques comme Bax ou Bad va conduire à la mort programmée. L'expression de Bcl-2 décline avec l'âge pendant que l'expression de Bax reste constante lors du processus de maturation des cellules (Wang et al., 1997). Ainsi, le ratio Bax/Bcl-2 change en faveur de l'apoptose. Ceci pourrait expliquer l'hypocellularité et la diminution de la synthèse du collagène et des protéoglycanes lors du vieillissement du cartilage (Adams and Horton, 1998).

Le facteur anti-apoptotique Bcl-2 protège les cellules contre l'apoptose induite par plusieurs stimuli comme la privation en facteurs de croissance, les radiations ionisantes, le stress thermique et le stress oxydatif. Bcl-2 a été trouvé dans le cytoplasme, plus exactement dans la mitochondrie, mais il n'a pas été trouvé dans le noyau (Wang et al., 1997). Bcl-2 est relié à la membrane externe de la mitochondrie et prévient la libération du cytochrome c (Kuan et Passaro, 1998).

Bcl-2 est exprimé dans le cartilage et dans les chondrocytes en culture. La technique d'immunohistochimie a montré que, dans le cartilage arthrosique, l'expression de Bcl-2 est plus basse que dans le cartilage normal (Kim et al., 2000). Dans le cartilage de souris transgéniques déficitaires en collagène de type II, des niveaux diminués de la

protéine Bcl-2 ont été trouvés, suggérant que les composants de la matrice extracellulaire sont importants pour la survie des chondrocytes (Yang et al., 1997).

6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'hypothèse de ce travail est que, dans les chondrocytes articulaires provenant des patients arthrosiques, l'endotheline-1 induit la production de l'oxyde nitrique de manière concomitante à la production de la MMP-1 et de la MMP-13, facteurs cataboliques importants impliqués dans la dégradation du cartilage humain. Notre objectif a été de démontrer les voies de signalisation empruntées par l'ET-1 pour contrôler la production de ces molécules. Cette étude a été ciblée sur la caractérisation du mécanisme d'action de l'ET-1 dans les chondrocytes provenant de patients arthrosiques. Dans ce travail, nous avons analysé l'effet de l'ET-1 sur la production des MMP-1, MMP-13 et du NO. En même temps, nous avons investigué le mécanisme par lequel l'ET-1 induit la production de ces molécules. En utilisant des inhibiteurs de protéines kinases et de la guanylate cyclase, nous avons analysé les voies de signalisation activées par l'ET-1 pour augmenter la production des MMP et du NO. De plus, nous avons analysé l'effet de l'ET-1 sur l'apoptose des chondrocytes en analysant la fragmentation de l'ADN, ainsi que des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (Bad et Bcl2).

CHAPITRE III : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sélection des spécimens

Les tissus humains ont été obtenus avec le consentement libre et éclairé des patients, suivant un protocole de recherche approuvé par le comité d'éthique en recherche de l'hôpital Notre-Dame à Montréal. Les cartilages ont été prélevés au cours de chirurgies de remplacement de genoux, à partir de 12 patients OA (58 ± 6 années, moyenne \pm l'écart-type). Nous avons effectué une évaluation histologique sur tous les spécimens, afin d'établir la sévérité des lésions arthrosiques. Les spécimens de cartilage ont été inclus en paraffine puis coupés et colorés avec le Safranine O et le fast green, et par la suite évalués en utilisant l'échelle histologique-histochimique de Mankin (Mankin et al., 1971). Cette échelle, de 0 à 14, est basée sur les 4 critères : la structure, la cellularité, la réduction de la coloration matricielle et l'invasion de la zone de démarcation par des vaisseaux sanguins. Seuls les tissus correspondants à un degré modéré de sévérité d'arthrose (score Mankin 3-7) ont été intégrés à ces études. Le cartilage a été prélevé au niveau de l'articulation du genou, au niveau de la zone fibrillée. Ce site est le point d'appui de l'articulation et à ce niveau, le score Mankin est en corrélation avec l'activité des enzymes protéolytiques (Dean et al., 1989).

Culture cellulaire

Le cartilage a été prélevé au niveau de l'articulation du genou, puis il a été rincé, coupé très finement et digéré pour obtenir les cellules (Reboul et al 1996, Roy-Beaudry et al.,

2003). La digestion du cartilage se fait en deux étapes. La première étape consiste en une incubation d'une heure avec de la pronase (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) et en présence d'un mélange de pénicilline (100 unités/ml) et de streptomycine (100 µg/ml) (PEN/STREP 1% ; Gibco BRL). La deuxième étape est une incubation de six heures effectuée avec la collagénase (2 mg/ml) (type IA; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) à 37°C, puis les cellules sont récupérées par filtration et centrifugation. Par la suite, les cellules ont étéensemencées à haute densité (10^4 cellules par cm^2) dans des contenants de culture et cultivées jusqu'à confluence dans du milieu de culture DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS; Hyclone, Logan, UT) chauffé et inactivé et 1% du mélange PEN/STREP, à 37°C dans une atmosphère humide à 5% CO_2 . Dans notre travail, nous avons utilisées seulement des cellules de premier passage.

La méthode ELISA pour la quantification des MMP-1 et MMP-13

Pour déterminer les niveaux des protéines MMP-1 et MMP-13 dans le milieu de culture, deux trousse de dosage ELISA pour quantifier la MMP-1 et la MMP-13 ont été utilisées. La trousse de dosage ELISA (Amersham Biosciences Corp., Baie d'Urfé, QC, Canada) pour la MMP-1, détecte spécifiquement la MMP-1 humaine (la MMP-1 active, la pro-MMP-1 et la MMP-1 complexée à des inhibiteurs tel la TIMP-1). La sensibilité du dosage est de 1,7 ng/ml et il n'existe pas d'activité hétérospécifique avec les MMP-3, MMP-2 et MMP-9. La trousse de dosage de MMP-13 (R&D Systems Inc,

MN, USA) est également spécifique de la forme activée et de la pro-forme de la protéine MMP-13. La sensibilité de cette méthode est de 0,032 ng/ml et il n'y a pas d'activité hétérospécifique avec les MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 et la MT1-MMP.

Les chondrocytes arthrosiques ont étéensemencés dans des plaques de 24 puits, pré-incubés pour 30 minutes avec les inhibiteurs des protéines kinases et de guanylate cyclase présents dans le Tableau 4 puis incubés pour une période de 24 heures en présence ou en absence d'ET-1 (10 nM). Après l'incubation, les milieux de culture ont été récoltés et les niveaux des protéines MMP-1 et MMP-13 ont été mesurés dans le milieu de culture, utilisant ces techniques ELISA spécifiques. Les résultats ont été exprimés en ng/ml/5x10⁵ cellules.

La méthode Griess pour le dosage d'oxyde nitrique (NO)

Le nitrite (NO₂-), un produit stable formé par le NO, a été mesuré dans le milieu cellulaire par une méthode spectrophotométrique basée sur la réaction de Griess (Green et al., 1982). La méthode Griess est une réaction colorimétrique du nitrite avec le réactif de Griess.

Pour examiner les effets de ET-1 sur la production de NO, une courbe dose-réponse a été effectuée en incubant des chondrocytes arthrosiques pendant une période de 24 heures à des concentrations croissantes (0-100nM) d'ET-1 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Ainsi, la production d'oxyde nitrique a été évaluée en présence de plusieurs inhibiteurs. Les chondrocytes ont été pré-incubés durant 30 minutes avec les inhibiteurs des protéines kinases et de guanylate cyclase présents dans le Tableau 4,

puis 24 heures avec l'ET-1 (10 nM). La production d'oxyde nitrique a été également évaluée en présence de l'inhibiteur de l'iNOS, L-NIL (Calbiochem EDM Biosc. Inc, San Diego). Les chondrocytes ont été pré-incubés durant 30 minutes avec différentes concentrations de L-NIL (0, 1, 10 et 50 μ M) puis 24 heures avec l'ET-1 (10 nM). Après l'incubation, les milieux de culture ont été récoltés et les niveaux des NO ont été déterminés dans le milieu de culture, utilisant la méthode Griess.

Étude de l'effet de l'ET-1, des protéine kinases et de guanylate cyclase sur la production des MMP-1 et MMP-13 et du NO.

Les voies de signalisation impliquées dans la production des MMP-1, MMP-13 et NO ont été étudiées en utilisant différents inhibiteurs de protéines kinases et de guanylate cyclase présents dans le Tableau IV.

Tableau IV - Inhibiteurs de protéine kinases et de guanylate cyclase

Inhibiteur	Concentration	Rôle
SB 202190	1 μ M	Inhibiteur de p38 MAPK
PD 98059	10 μ M	Inhibiteur spécifique de MEK1/2
Wortmannin	100 nM	Inhibiteur de PI3K
KT5720	4 μ M	Inhibiteur de PKA
LY 83583	2 μ M	Inhibiteur de guanylate cyclase

La concentration des inhibiteurs utilisée dans cette étude est basée sur des résultats déjà publiés (Jovanovich et al 1998; Khatib et al 2002). Tous les inhibiteurs proviennent de Calbiochem EDM Biosciences Inc. San Diego, CA.

Les chondrocytes OA ont été pré-incubés durant 30 minutes avec différents inhibiteurs, puis incubés pour une période additionnelle de 24 heures avec de l'ET-1 (10 nM). Après les incubations, les milieux de culture ont été collectés et la concentration des protéines MMP-1, MMP-13 et NO ont été déterminés par les méthodes ELISA et Griess.

Western blot

Nous avons détecté les protéines à partir de lysats cellulaires. Les chondrocytes arthrosiques confluents ont été incubés en présence ou en absence (contrôle) de 10 nM ET-1. Les cellules ont été lysées dans un tampon 25 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml leupeptin, pH 7.5. La concentration protéique des lysats cellulaires a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Pour pouvoir identifier les protéines selon leurs poids moléculaires, nous avons utilisé la technique du Western Blot. La séparation des protéines (10 µg) a été faite par l'électrophorèse SDS-PAGE (système Bio-Rad) dans des mini-gels contenant un gel de concentration de 4% et un gel de séparation 10% sulfate de sodium dodecyl (SDS), immergés dans un tampon de migration (Tris-Glycine-SDS 1X), à la température de la

pièce, sous 100 Volts (appareil Bio-Rad). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C extra; Amersham, Pharmacia Biotech Buckinghamshire, UK) . Le transfert a eu lieu à 4°C sous 120 Volts dans un appareil Bio-Rad et a duré 1 heure. Les membranes ont ensuite été immergées toute la nuit dans un tampon bloquant 2% Super Block Blocking buffer (Pierce, Rockford, IL). Puis, elles ont été rincées dans du T-TBS 1X (200 mM Tris base, 1.5 M NaCl, pH à 7.5 et 1% Tween-20) 2-3 fois successivement, 5-10 minutes chaque rinçage. Enfin, les membranes ont été incubées 24 heures à 4°C avec agitation avec un anticorps primaire. Les différents anticorps primaires utilisés pour ces études sont identifiés dans le tableau V.

Tableau V - Anticorps primaires utilisés pour analyse par Western blot

Anticorps	Types d'anticorps primaire	Dilution
Phospho-p38	monoclonal de souris	1/1000
P38-total	monoclonal de souris	1/1000
Phospho-p44/42	monoclonal de souris	1/5000
Phospho-Akt	monoclonal de souris	1/2000
Phospho-SAP/JNK	monoclonal de souris	1/1000
Actin C-terminal fragment	monoclonal de souris	1/5000
iNOS	polyclonal de lapin	1/1000

Tous les anticorps primaires utilisés proviennent de New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada.

Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les membranes ont été rincées dans T-TBS 6 fois successivement, 5-10 minutes chaque rinçage. Puis les membranes ont été réincubées pour 1 heure à la température ambiante avec agitation avec un anticorps secondaire anti-IgG (de souris ou de lapin) conjugué à la peroxydase. Les anticorps secondaires utilisés pour analyse par Western Blot sont indiqués dans le tableau VI.

Tableau VI - Anticorps secondaires utilisés pour analyse par Western blot

Anticorps	Types d'anticorps secondaire	Dilution
Phospho-p38	Chèvre anti-souris	1 / 25 000
P38-total	Chèvre anti-souris	1 / 25 000
Phospho-p44/42	Chèvre anti-souris	1 / 25 000
Phospho-Akt	Chèvre anti-souris	1 / 25 000
Phospho-SAP/JNK	Chèvre anti-souris	1 / 25 000
Actin C-terminal fragment	Chèvre anti-souris	1 / 25 000
iNOS	Chèvre anti-lapin	1 / 40 000

Ensuite, les membranes ont été rincées dans T-TBS 1X 6 fois successivement, 5-10 minutes chaque rinçage. Puis les protéines ont été révélées avec le substrat Super Signal Ultra Western blot chemiluminescence system (Pierce) et la détection a été effectuée à l'aide de films Kodak Biomax.

Apoptose

L'apoptose a été analysée par deux méthodes. Premièrement, une méthode basée sur le marquage de l'ADN fragmenté, qui s'appelle la méthode TUNEL a été utilisée (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD). Par la suite, une méthode basée sur la détection de protéines apoptotiques (la technique d'immunocytochimie) a été employée.

Les chondrocytes arthrosiques ont étéensemencés sur des chambres Lab-Tec (Nalge Nunc International, Naperville IL). Lorsque les cellules sont à confluence, les milieux ont été retirés et les cellules ont été incubées pour 72 heures à 37° C dans du DMEM contenant 2.5% de sérum de veau fœtal avec ou sans ET-1 (10nM). À l'aide d'une coloration *in situ* utilisant la méthode TUNEL, nous avons détectées les cellules apoptotiques. Les nucléotides biotinylés sont détectés en utilisant une peroxydase horseradish streptavidine (POD) et révélés avec la DAB (diaminobenzidine) (Dako Diagnostics). Pour déterminer la spécificité de la coloration, deux contrôles ont été utilisés : un contrôle négatif où le TdT a été omis et un contrôle positif où les cellules ont été traitées pendant 15 minutes à 37°C avec de la DNase I (0.1 µg/ml).

Comme protéines apoptotiques, nous avons choisi de déterminer la protéine pro-apoptotique Bad et la protéine anti-apoptotique Bcl2. La détection immunocytochimique de ces deux protéines a été effectuée utilisant des anticorps spécifiques anti-Bad et anti-Bcl2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Les cellules positives ont été détectées par un deuxième anticorps IgG anti-souris conjugué à la POD et révélé avec le DAB. Pour effectuer l'évaluation de l'effet protecteur ou non de l'ET-1 sur les chondrocytes arthrosiques, nous avons calculé des ratios :

Bcl2+/Bad+ dans les contrôles et les chondrocytes stimulés avec l'ET-1. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen des cellules colorées positivement \pm l'écart-type.

L'analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm l'écart-type. Les analyses statistiques ont été faites par le test Mann-Whitney, et la valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme étant significative.

CHAPITRE IV : MANUSCRIT

ACCORD DES COAUTEURS

Cristina Alexandra Manacu
2-484-1-0 M.Sc. Sc. Biomédicales, Option Recherche Clinique

Cristina Alexandra Manacu, Johanne Martel-Pelletier, PhD, Marjolaine Roy-Beaudry, MSc, Jean-Pierre Pelletier, MD, Julio C. Fernandes, MD, MSc, Fazool Shpkolye, MSc, Dragoslav R. Mitrovic PhD and Florina Moldovan, MD, PhD

Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and up-regulates collagenase production
Arthritis Research and Therapy
soumis

A) Déclaration des coauteurs d'un article

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Cristina Alexandra Manacu inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Mécanisme d'action de l'ET-1 dans les chondrocytes articulaires des patients arthrosiques.

[Redacted Signature] _____

Johanne Martel-Pelletier, Coauteur Signature Date

[Redacted Signature]

19-07-04

Marjolaine Roy-Beaudry, Coauteur Signature Date

[Redacted Signature]

11/03/04

Jean-Pierre Pelletier, Coauteur Signature Date

[Redacted Signature]

02/11/2004

Julio C. Fernandes, Coauteur Signature Date

[Redacted Signature]

Fazool Shpkolye, Coauteur Signature Date 22/06/04

[Redacted Signature]

6. 11 2004

Dragoslav R. Mitrovic, Coauteur Signature Date

[Redacted Signature]

01/10/04

Florina Moldovan, Coauteur Signature Date

CONTRIBUTION AUX ARTICLES

J'ai contribué à la réalisation des manipulations, en particulier aux tests ELISA de la MMP-1 et de la MMP-13, aux mesures des protéines et du NO et à la majorité des Western blots inclus dans ce manuscrit. J'ai également réalisé les analyses statistiques et les investigations de l'apoptose ainsi que les détections immunohistochimiques des protéines Bad et Bcl2. J'ai mis au point la technique d'immunohistochimie puis pris les photos des coupes. Enfin, j'ai pris part à la rédaction de l'article (partie méthodologie) et réaliser les figures.

Dr Jean-Pelletier et Dr Johanne-Martel Pelletier, directeurs de l'Unité de recherche en Arthrose, ont contribué à ce mémoire en apportant leur expertise sur les voies de signalisation. Ils ont également participé à la discussion des résultats obtenus et à la critique de l'article. Certaines des infrastructures utilisées dans ce travail ont été fournies par leur laboratoire.

Marjolaine Roy-Beaudry a effectué plusieurs manipulations et expériences dont la culture cellulaire des chondrocytes qui ont servis aux différentes expériences et en particulier à celles réalisées avec l'inhibiteur de la iNOS (LNIL). Elle a réalisé une partie des Western blots inclus dans ce manuscrit. De plus, elle a participé à la préparation des figures représentatives des résultats obtenus.

Julio C. Fernandez nous a fourni des tissus humains provenant de patients opérés dans le Service d'Orthopédie du CHUM selon les règles d'éthique. Il a aussi collaboré à la discussion des résultats obtenus.

Fazool Shipkolye a participé à la réalisation de l'article en effectuant la préparation des cellules à partir des tissus de cartilage ainsi qu'en effectuant certain dosage ELISA. De plus, il a grandement participé à la révision et à la correction de la version anglaise.

Dragoslav R. Mitrovic a eu une contribution scientifique en participant à la rédaction du manuscrit et au développement du design de l'étude et à la révision.

Florina Moldovan a élaboré et planifié cette recherche. Le travail a été réalisé sous sa direction à partir de la conception, l'acquisition des résultats, l'analyse et l'interprétation des données jusqu'à la préparation du manuscrit et la soumission de l'article pour publication. Le travail a été également financé par les fonds provenant des IRSC (subvention accordée au Dr Moldovan)

**ENDOTHELIN-1 IN OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES TRIGGERS
NITRIC OXIDE PRODUCTION AND UP-REGULATES COLLAGENASE
PRODUCTION**

**Christina Alexandra Manacu¹, Johanne Martel-Pelletier², Marjolaine Roy-
Beaudry¹, Jean-Pierre Pelletier², Julio C. Fernandes³, Fazool S. Shipkolye¹,
Dragoslav R. Mitrovic⁴ and Florina Moldovan^{1,5}**

Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine¹, Centre Hospitalier de l'Université de
Montréal, Unité de recherche en Arthrose, Hôpital Notre-Dame², Hôpital Sacré Cœur³,
INSERM U-606, Hôpital Lariboisière, Paris, France⁴, Faculté de médecine dentaire,
Université de Montréal, Montréal (Qc), Canada⁵

Keywords: endothelin-1, metalloproteases, nitric oxide, osteoarthritis, signalling
pathways.

Please address all correspondence and reprint requests to Florina Moldovan, M.D,
Ph.D., Assistant Professor, Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal,
Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 3175, Côte Sainte-Catherine, 4^e étage,
porte 4731, Montréal (Québec) H3T 1C5, Tél. : (514) 345 4931 ex : 5746, Fax :
(514)345 4801.

Running title: ET-1 up-regulates NO and collagenases production in OA
chondrocytes.

ABSTRACT

The mechanism of ET-1-induced NO, MMP-1 and MMP-13 productions was investigated in human OA chondrocytes. The cells were isolated from human articular cartilage obtained at surgery, and cultured in the absence or presence of ET-1 with or without inhibitors of protein kinase or LY83583 (an inhibitor of soluble guanylate cyclase and of cGMP). MMP-1, MMP-13 and NO levels were then measured by ELISA and Griess reaction, respectively. Additionally, iNOS and phosphorylated forms of p38 MAP kinase, p44/42, SAP/JNK and serine-threonine Akt kinase were determined by Western blot. Results show that ET-1 greatly increased MMP-1 and MMP-13 production, iNOS expression and NO release. LY83583 decreased the production of both MMPs below basal levels, whereas the inhibitor of p38 kinase, SB202190, suppressed ET-1-stimulated production only. Similarly, the ET-1-induced NO production was partially suppressed by the p38 kinase inhibitor and completely suppressed by the PKA kinase inhibitor, KT5720, and LY83583, suggesting the involvement of these enzymes in relevant ET-1 signaling pathways. In human OA chondrocytes, ET-1 controls the production of MMP-1 and MMP-13. ET-1 also induces NO release via iNOS induction. Thus, ET-1 and NO should become important target molecules for future therapies aimed at stopping cartilage destruction.

INTRODUCTION

Cartilage degradation in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) constitutes a major structural change in the joint, which may severely impair its function causing pain and disability. This degradation is accompanied by the release in the synovial fluid of degraded matrix constituents that primarily result from an increased matrix catabolism [1]. Various factors are directly involved in this process. Endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor and pro-mitogen peptide for many cell types, including chondrocytes, was recently identified as one such factors [2;3].

ET-1 binds to the specific ETA or ETB receptors expressed on chondrocytes [4] and triggers a cascade of intracellular events, including phospholipase C activation [5], increase in intra-cellular calcium [6;7], prostaglandin production [8] and nitric oxide (NO) release [9]. The effect of ET-1 on DNA and protein synthesis in chondrocytes is biphasic. The potent initial stimulatory effect of ET-1 decreases progressively with time and is followed by an inhibition [3;8]. The inhibitory effect seems to be mediated by NO and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) both produced in response to ET-1 stimulation [8;9]. Additionally, we have recently demonstrated that ET-1 is significantly increased locally in OA cartilage and synovial membrane when compared with normal tissues. In OA cartilage, ET-1 is involved in cartilage catabolism through metalloprotease (MMP) regulation and the induction of type II collagen breakdown [2]. MMPs are a family of structurally related zinc-dependent neutral endopeptidases classified into subgroups of collagenases, gelatinases, stromelysins, membrane-type MMPs and other MMPs [10]. When activated, MMPs degrade a broad spectrum of

substrates, including collagens and other matrix macromolecules. As a whole, MMPs play an important role in the extracellular matrix (ECM) remodelling which occurs under physiological and pathological conditions. Among all the MMPs, we have recently demonstrated an induction in the synthesis, secretion and activation of two collagenases (MMP-1 and MMP-13) by ET-1 [2]. These MMPs play an active role in the progression of OA pathology as they are the most effective at initiating collagen destruction during the inflammatory process and the remodelling phase of the disease [11;12].

Another deleterious agent in joint cartilage is the NO radical [13;14], which down regulates DNA [8] and matrix synthesis [14] and up regulates matrix degradation via increased MMP synthesis [15]. Indeed, inhibition of NO production was shown to slow down the progression of OA. It has been demonstrated that, *in vitro*, NO could also up-regulate MMP synthesis and activity in joint chondrocytes and cartilage [15]. *In vivo*, in an OA animal model, selective inhibition of the inducible NO synthase (iNOS) provides a protective effect on OA joint tissues more specifically in regard to the degradation of the ECM and the down-regulation of MMP [16].

The aim of this study was to further investigate the role of ET-1 in human OA chondrocytes focusing on NO, MMP-1 and MMP-13 production as well as the relevant signaling pathways activated by ET-1 in human OA chondrocytes in regard to these factors.

MATERIALS AND METHOD

Specimens. Human cartilage was obtained with the consent of 12 OA patients (58 ± 6 years, mean \pm SEM) undergoing total knee replacement.. The Institutional Ethics Committee Board of Notre Dame Hospital in Montreal, Canada approved the study protocol. Tissue specimens were embedded in paraffin, sectioned and stained with Safranin O and fast green and evaluated using the Mankin histological/histochemical scale [17]. Only tissues corresponding to a moderate degree of OA severity (Mankin 3-7) were included in this study. Cartilage was sectioned from the tibial plateaus, rinsed, finely chopped and cells released by enzymatic digestion performed as previously described [2;11]. The cells were seeded in culture flasks at the density of 10^4 cells per cm^2 and grown to confluence in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Hyclone, Logan, UT) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL). Only first-passage-cultured cells were used.

MMP-1 and MMP-13 quantification. MMP-1 and MMP-13 protein levels were determined in the culture media using specific ELISA assays. The ELISA assay (Amersham Biosciences Corp., Baie d'Urfé, Québec, Canada) for MMP-1 specifically detected the total human MMP-1, ie. active MMP-1, the latent enzyme and the enzyme complexed with inhibitors such as TIMP-1. The sensitivity of this assay is 1.7 ng/ml, and there is no significant cross-reactivity or interference with MMP-3, MMP-2 and MMP-9. The MMP-13 ELISA assay (R&D Systems Inc, MN, USA) is a monoclonal

polyclonal based assay specific for both the active and latent MMP-13. Its sensitivity is 0.032 ng/ml and there is no cross-reactivity with MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 and MT1-MMP. Results are expressed as ng/5 x 10⁵ cells.

The effect of ET-1, protein kinase inhibitors and a guanylate cyclase inhibitor (LY83583) on MMP-1, MMP-13 and NO production. MMP-1, MMP-13 and NO productions were studied in the absence and presence of ET-1 and using various inhibitors. 1) SB 202190 (1 μ M: inhibitor of p38 MAPK); 2) PD 98059 (10 μ M: a selective MEK1/2 inhibitor); 3) Wortmannin (100 nM: a PI3K inhibitor); 4) KT5720 (4 μ M: a PKA inhibitor); and 5) LY83583 (2 μ M: an inhibitor of NO-dependent soluble guanylate cyclase inhibitor). All inhibitors were purchased from Calbiochem EDM Biosciences Inc. San Diego, CA, and the active concentrations chosen is based on the literature or assayed in preliminary experiments [18;19]. ET-1 was purchased from (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Confluent OA chondrocytes were pre-incubated for 30 minutes with these inhibitors and then 10 nM of ET-1 was added for 24 hours. Following incubation, the MMP-13 and MMP-1 protein and NO levels were determined in the media of six independent cultures as described below.

Nitric oxide (NO) determination. Nitrite (NO₂⁻), a stable end product of NO, was measured in the media of cultured cells using a spectrophotometric method based on Griess reaction [20]. To examine the effects of ET-1 on NO production, a dose-response curve was performed by incubating OA chondrocytes for 24 hours with increased concentrations (0 -100 nM) of ET-1 or pre-treated with protein kinase

inhibitors or a guanylate cyclase inhibitor and ET-1 as described above. Nitric oxide production was also evaluated in the presence of the iNOS inhibitor, L-NIL (Calbiochem EDM Biosc. Inc, San Diego). Chondrocytes were pre-incubated for 30 minutes with 0-50 μ M L-NIL and then incubated for 24 hours with 10 nM ET-1. The media were collected and released NO levels determined. Results are expressed as $\text{nmol}/5 \times 10^5$ cells \pm SEM or as percentage of the control cultures.

Western Blot. Confluent OA chondrocytes were incubated in the presence or absence (control) of 10 nM ET-1, and the cells were lysed in 0.2 ml of lysis buffer (25 mM HEPES, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml leupeptin, pH 7.5). The protein concentration of the lysate was determined with the Bradford dye assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For Western Blot, 10 μ g of lysate protein was separated by electrophoresis on a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) discontinuous gradient polyacrylamide gel. Separated proteins were then transferred electrophoretically onto a nitrocellulose membrane (Hybond C extra; Amersham, Pharmacia Biotech Buckinghamshire, UK). The membranes were immersed overnight in the Super Block Blocking buffer (Pierce, Rockford, IL), rinsed and incubated 24 hours at 4°C with one of the mouse monoclonal primary antibody (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada) specifically recognizing: 1) phosphorylated p38 or total p38 (dilution: 1/1000); 2) phosphorylated p44/42, (dilution: 1/5000); 3) phosphorylated Akt (dilution: 1/2000) 4) phosphorylated SAP/JNK (dilution: 1/1000) and actin C-terminal fragment (dilution: 1/5000). iNOS was detected with a rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, (dilution:

1/1000)). Following incubation with primary antibody, membranes were carefully washed and re-incubated for 1 hour at 4°C with a second antibody (anti-rabbit IgG). Anti-mouse horseradish peroxidase (POD)-conjugated IgG (dilution: 1/25000) was used for the detection of the monoclonal antibody and sheep anti-rabbit IgG, POD-conjugated (dilution: 1/40000) for the polyclonal antibody. Detection was performed using the Super Signal Ultra Western blot chemiluminescence system (Pierce) [11].

Apoptosis. Apoptosis was investigated in OA chondrocytes cultured on Lab-Tec chamber slides (Nalge Nunc International, Naperville IL). At confluence, the cells were rinsed and incubated at 37° C for 72 hours in DMEM containing 2.5% heat-inactivated FCS in the absence or presence of 10 nM human recombinant ET-1. Apoptotic cells were detected by *in situ* staining using the TUNEL method (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD). Both pro-apoptotic Bad and anti-apoptotic Bcl2 proteins were determined by immunocytochemical detection using specific anti-Bad and anti-Bcl2 antibodies (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The results are expressed as mean percentage of positively stained cells according to previous published method [21;22].

Statistical Analysis. Data are expressed as mean \pm SEM of 5-6 independent cultures. Statistical significance was assessed by the Mann-Whitney test, and $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

ET-1 induces MMP-1 and MMP-13 production. The effects of ET-1 and those of various inhibitors on MMP-1 and MMP-13 productions are shown in Fig. 1. At 10 nM ET-1 the production of both enzymes was significantly increased ($p < 0.005$). SB202190, a p38 inhibitor, completely suppressed the ET-1-stimulated production of both enzymes, whereas the PI3K inhibitor, Wortmannin, and the PKA inhibitor, KT5720, partially but significantly ($p < 0.01$) decreased the level of MMP-13, only. Interestingly, the most potent inhibitor of MMP-1 and MMP-13 production was LY83583, an inhibitor of NO-dependent soluble guanylate cyclase and of cGMP. This agent not only suppressed the ET-1-induced stimulation, but also decreased the level of both enzymes below the basal level: a significant difference was found for both MMP-13 and MMP-1 when compared to the ET-1 stimulation ($p < 0.005$) and for MMP-13 when compared to the control ($p < 0.05$). Although a decrease in MMP-13 was noted with the MEK1/2 kinase inhibitor, PD98059, at the concentration tested, it did not reach statistical significance. With this inhibitor, no effect was found on MMP-1 production.

ET-1 induces NO production. The effects of ET-1 on NO release and on iNOS expression are shown in Fig. 2. Figure 2a shows that ET-1 greatly stimulated NO production and was released in a concentration-dependent manner. Incubation with increasing concentrations of ET-1, from 0.1 nM to 100 nM, augmented by almost 12-fold the linear accumulation of NO. To determine the mechanism involved in the ET-1-

induced NO production, the effects of the major intracellular signaling pathways were investigated. Figure 2b shows that the ET-1-induced NO release was significantly inhibited by p38 inhibition and prevented by KT5720, a PKA inhibitor. No significant effect was noted for MEK1/2 inhibition by PD98059 and by Wortmannin. Moreover, the guanylate cyclase inhibitor LY83583 reduced the NO production as significant differences were found when compared to either the ET-1 stimulation ($p < 0.05$) and to the control ($p < 0.05$), and this inhibitor also decreased both the endogenous and ET-1-induced iNOS level (Figure 2d). The ET-1-induced NO release occurs via iNOS as shown in Figure 2c: complete inhibition of iNOS by 50 μM of an allosteric iNOS inhibitor, L-NIL, as expected, almost completely inhibited NO release. Fig. 2d shows the effects of various inhibitors on iNOS expression, as determined by Western blot analysis of cell extracts. The 24 h incubation of cells with ET-1 results in an increase of iNOS protein (Fig. 2d, lane 2). The ET-1-induced iNOS protein expression was completely suppressed by SB202190 and LY83583 and partially suppressed by Wortmannin and KT5720. PD98059 had no effect.

Intracellular protein kinase phosphorylation in the presence of ET-1. Figure 3 (a-d) shows the effects of ET-1 on the phosphorylation of p38, Akt, p44/42 and SAP/JNK kinases as detected by Western blot of cell extracts. ET-1 at 10 nM induced in a time-ordered manner p38, Akt, p44/42, and SAP/JNK phosphorylation. For p38, maximal effect following cell exposure to ET-1 was obtained at 10 minutes. For Akt, effect was observed at 2 min of cells exposure and this effect persists during 30 minutes, followed by a decline at 45 minutes. At this time (45 minutes), both p38 kinase and Akt

phosphorylated forms were diminished. Maximal effect was obtained at 15 minutes for p44/42 kinase and at 45 minutes for SAP/JNK. The SAP/JNK phosphorylated forms were not detected at 60 minutes, whereas that of p44/42 decreased, but was still present even at 60 minutes.

ET-1 did not affect apoptosis. As ET-1 induces NO release and because the accumulation of NO causes apoptosis, we explored this potential effect. OA chondrocytes incubated in the absence (control) or presence of ET-1 (10 nM) for 72 hours showed that ET-1 did not affect apoptosis (TUNEL reaction; data not shown) nor the production of either anti-apoptotic Bcl2 or pro-apoptotic Bad proteins. A similar percentage of positively stained cells was found for: Bcl2 (42.8 ± 5.1 and 43.2 ± 4.3 % for the control and ET-1 respectively) and for Bad ($10.1 \pm 3.8\%$ and $9.5 \pm 2.1\%$).

DISCUSSION

This study shows an overproduction of NO, MMP-1 and MMP-13 in human OA chondrocytes stimulated by ET-1. This goes beyond previous results [2], which showed that human OA synovial tissue and joint cartilage express ET-1 gene and overproduce ET-1 resulting in an excessive synthesis of MMP-1 and MMP-13 in the same tissues. In addition, it goes beyond these findings and enlightens the mechanism by which ET-1 accomplishes this action. Strong evidence was obtained for the key role played by NO whose production and release were also up-regulated by ET-1.

NO induces smooth muscle cell relaxation by activating soluble guanylate cyclase and increasing intracellular concentration of cGMP. LY83583 suppresses the effect of NO by inhibiting this NO-dependent production of cGMP [23]. In this study, LY83583 was also shown to strongly inhibit MMP-1 and MMP-13 production by unstimulated and ET-1-stimulated OA chondrocytes showing the key role of cGMP for the synthesis of these enzymes. This finding confirms previous observation that cGMP is necessary for protein synthesis [9], and brings further evidence that an excess of NO is harmful to cells.

It is generally accepted that progressive tissue destruction in RA and OA, results from an excessive breakdown mediated by various proteolytic enzymes and other catabolic agents such as free radicals and NO [1;13;24;25]. Our results suggest that ET-1 should also be added to the list of potential deleterious agents that may account for articular cartilage destruction in rheumatic diseases. The action of ET-1 seems to be dual via an increase in MMP and NO production. ET-1-induced stimulation of MMP-1 and MMP-13, as well as the induction of iNOS gene expression with subsequent NO overproduction by OA chondrocytes, may interfere with the pro-inflammatory cytokine pathways. Indeed, we and others have shown that IL-1 β up-regulates the synthesis of ET-1 [3], which in turn, can induce IL-1 β gene transcription and consequently the production of the protein [26]. We previously demonstrated [2] that MMP-13 expression was induced similarly by ET-1 and IL-1 β while although both enhanced MMP-1 expression, the effect of IL-1 β was more potent on this enzyme. Interestingly, by using a specific immunoassay measuring C telopeptide of type II collagen fragments

on OA cartilage explants, we also found that the level of the cleaved collagen fragments were significantly increased in the presence of both IL-1 β and ET-1 with a more potent effect observed for ET-1. This could be explained by a putative synergy between ET-1 and IL-1 β as ET-1 induces IL-1 β and as IL-1 β has a positive feedback on ET-1 synthesis [19;27].

At physiological concentrations, NO is an important signaling molecule [28], but when overproduced via iNOS gene activation it is toxic to cells [29]. It triggers the transcription of several pro-inflammatory genes [28;30], interacts with the cysteine residues of many proteins (S nitrosylation) and may alter their structure and function. In the presence of the superoxide anion, NO generates peroxynitrite and hydroxyl radicals that are cytotoxic, inducing peroxydation of lipids and damaging other molecules, such as DNA, and matrix macromolecules. This finally results in the inhibition of many cellular processes that impair the capacity of the cells to synthesize matrix macromolecules and repair damaged tissue [8;31].

In addition to the findings discussed above, this study sheds more light on the major signaling pathways involved in the ET-1-induced MMP-1 and MMP-13, and NO productions. In OA chondrocytes, ET-1 seems to stimulate the production of these enzymes through activation of, at least, two kinases, p38 MAP and PKA kinases. As shown by Western blot analysis of the cell extracts, incubation of cells for a short period of time with ET-1 results in the phosphorylation of p38 MAP, p44/42, SAP/JNK and Akt kinases. This effect occurs within minutes following a challenge with ET-1 and disappears after 45 and 60 minutes for the p-38 and SAP/JNK kinases respectively.

The activation of these kinases is probably necessary for the induction by ET-1 of MMP-1 and MMP-13 productions. The inhibition of p38 kinase is associated with a suppression of the ET-1-induced stimulation of both enzymes whereas the inhibitions of adenylyl cyclase-dependent, PKA kinase is associated with a partial suppression of the ET-1-induced stimulation of MMP-13 production, only. This suggests that these inhibitors are specific for the ET-1 activated pathways since they do not affect the basal levels of MMP-1 and MMP-13.

Another point also deserves consideration. Tardif et al [32], have described two OA chondrocyte populations distinctive by their MMP-13 content and response to IL-1 β . One contains small amounts of MMP-13 protein and is highly sensitive to IL-1 β stimulation; the other is enriched in MMP-13 protein but poorly respond to the cytokine. The cell heterogeneity of OA cartilage may explain some variability of the results observed in our study particularly in case of using low doses of the MEK $\frac{1}{2}$ inhibition followed by ET-1 stimulation. In fact, when MAPK pathways (ERK, JNK and p38) are activated in chondrocytes, their inhibition is dependent of the inhibitors concentration used particularly for SB 203580 and PD 98059 [18]. PD 98059 which had no effect in this study at the concentration of 10 μ M on ET-1-induced iNOS expression and NO production was demonstrated in other studies to suppress NO induction in human chondrocytes as shown in Gemba et al. [18].

The phosphorylation of p38 MAP kinase by ET-1 was also described in osteoblast-like cells [33] and in cardiac myocytes [34] while in chondrocytes overproducing MMP-1 and MMP-13 this MAP kinase was shown to be phosphorylated principally by IL-1 β [35]. Activation of PKA was shown to be required for the up-regulation of iNOS and

the subsequent production and release of NO by several cell types such as vascular smooth muscle cells [36], cardiac myocytes [37] and human macrophages [38]. It is also associated with the cytokine-induced NO production in human OA articular chondrocytes [39]. Our results suggest that the activation of PKA is also required for the ET-1-induced up-regulation of iNOS and subsequent production of NO by human OA chondrocytes. However, PKA activation seems to be less required for the ET-1-induced up-regulation of MMP-13 and not at all for the up-regulation of MMP-1 since the inhibition of PKA with KT5720 does not affect the ET-1-induced overproduction of this enzyme. In this study, subtle differences are shown in the pattern of inhibition of the ET-1-induced overproduction of MMP-1 and MMP-13. The effect of ET-1 on MMP-13 production was more sensitive to the inhibitors of protein kinases than on MMP-1 production. As suggested above, these variable responses point out to possible different cell populations producing these two enzymes or relevant signaling pathways eliciting the ET-1-induced stimulations [35].

We also tested the hypothesis that ET-1 may act in OA through induction of apoptosis. This was based on the findings that cells of the superficial layer disappear during cartilage degeneration [40], that ET-1 is preferentially produced in this layer [2] and that NO may induce apoptosis and cells death at high concentrations [29]. Indeed, chondrocytes death may represent one of the contributing factors in cartilage destruction. However, as shown in this study, ET-1 does not appear to induce chondrocyte apoptosis or cell death. Using the TUNEL technique (which was recently shown to detect both apoptosis and cell death [29]), and using Bcl2 and Bad proteins determination, no differences were found between ET-1-treated and control cultures.

CONCLUSION

This study shows that ET-1 causes an overproduction of NO, MMP-1 and MMP-13 in human OA chondrocytes. Additionally, the signaling pathway used by ET-1 in these cells was demonstrated. The fact that ET-1 possesses the biological properties described above, acknowledge this peptide as an important catabolic factor contributing to the cartilage destruction via induction of the deleterious molecules such as MMPs and NO. NO seems to be a key molecule which is produced in parallel with the ET-1-induced over production of the MMPs. Thus, blocking the effects of ET-1 may become a useful therapeutic approach aimed at stopping cartilage destruction in rheumatic conditions such as RA and OA.

Abbreviation List

OA = Osteoarthritis

RA = Rheumatoid arthritis

ET-1 = Endothelin-1

NO = nitric oxide

cGMP= cyclic guanosine monophosphate

MMP = metalloprotease

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ECM = extracellular matrix

iNOS = inducible NO synthase

TIMP-1 = tissue inhibitor of matrix metalloproteinases

PKA = Protein Kinase A

MEK1/2 = mitogen-activated protein kinase kinase 1/2

L-NIL = L-N⁶ (1-iminoethyl)lysine)

FCS = fetal calf serum

MAPK = mitogen-activated protein kinase

SAP/JNK = stress-activated protein kinase /Jun-N-terminal kinase

IL-1 β = Interleukin 1 beta

TNF- α = tumor necrosis factor alpha

POD = horseradish peroxidase

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (DSH-44200 and MOP-57760). We thank Heather Yampolsky for her excellent assistance in manuscript preparation.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of protein kinase inhibitors and LY83583 on ET-1-induced MMP-13 and MMP-1 production by human OA chondrocytes. Confluent monolayer chondrocytes were pre-incubated 30 minutes at 37°C with SB 202190 (1 μ M), PD98059 (10 μ M), Wortmannin (100 nM), KT5720 (4 μ M) or LY83583 (2 μ M) for 30 minutes at 37°C, then challenged with ET-1 for 24 hours. MMP-13 and MMP-1 proteins were measured in the culture media using specific ELISA assays. *P* values indicate significant differences comparing experimental conditions with ET-1 treatment alone (*) and versus the control cultures (#). Values are expressed as mean \pm SEM of 5 independent experiments performed in duplicate. # and * indicate significant differences $P < 0.05$; ## and **: $P < 0.01$; ### and ***: $P < 0.005$.

Figure 2. Effect of ET-1 on NO release and iNOS expression by human OA chondrocytes. NO was measured in the culture media and iNOS protein detected in cell extracts and revealed by Western blot using specific antiserum as described in Material&Methods. a: Concentration-dependent ET-1-induced NO accumulation in the culture media from confluent human OA chondrocytes treated with ET-1 (0-100 nM) at 37°C for 24 hours. b: Effect of protein kinase inhibitors and of guanylate cyclase inhibitor on ET-1-induced NO release in OA chondrocytes. Confluent monolayer chondrocytes were pre-incubated with SB 202190 (1 μ M), PD98059 (10 μ M), Wortmannin (100 nM), KT5720 (4 μ M) or LY83583 (2 μ M), for 30 minutes at 37°C then challenged with ET-1 for 24 hours, and NO determined in the culture media. c: Effect of iNOS inhibition on NO release induced by ET-1 in human OA chondrocytes.

The chondrocytes were pre-treated with the allosteric inhibitor of iNOS, L-NIL, (0-50 μM) for 30 minutes and then incubated with ET-1 (10 nM) for an additional 24 hours. NO level was measured in the culture media. d: Effect of protein kinase inhibitors and LY83583 on ET-1-induced iNOS in human OA chondrocytes. Chondrocytes were pre-incubated with SB 202190 (1 μM), PD98059 (10 μM), Wortmannin (100 nM), KT5720 (4 μM) or LY83583 (2 μM), for 30 minutes at 37°C then challenged with ET-1 for 24 hours, and iNOS was quantified. In a, b and c values are the mean \pm SEM of 6 independent experiments performed in duplicate. In d representative blot of 3 independent experiments is shown. *P* values indicate significant difference between ET-1 treated cells and cells treated with indicated inhibitors + ET-1 (*) and versus control (#). # and * indicate significant differences $P < 0.05$, ### and *** indicate significant differences $P < 0.005$.

Figure 3. Phosphorylation of p38 MAP kinase, Akt, p44/42 and SAP/JNK by ET-1 in human OA chondrocytes. a: Western immunoblot of p38 MAP kinase. Confluent human OA chondrocytes were incubated with ET-1 (10 nM) for 10 or 45 minutes and cell extracts were prepared as described in Material and Methods. Western immunoblots using antiserum against activated (phospho-p38) and total p38 MAP kinase (p38 T). A representative result of 3 different experiments is shown. b: Western immunoblot of Akt. Cells were incubated for 2, 5, 15, 30, 45 or 60 minutes in presence of ET-1 (10 nM) and cell extracts were prepared as described in Materials and Methods. Western immunoblot was done using an antiserum specific for phospho Ser 473 of Akt. A representative result of 3 different experiments is shown. c: Western

immunoblot of p44/42. Confluent human OA chondrocytes were incubated with ET-1 (10 nM) for 0, 5, 15 or 60 minutes and cell extracts were prepared as described in Material and Methods. d: Western immunoblot of SAP/JNK protein kinase. Confluent human OA chondrocytes were incubated with ET-1 (10 nM) for 0, 5, 30, 45 and 60 minutes and cell extracts were prepared as described in Material and Methods. Actin detection was used as a control of the level of proteins loaded. Representative blot of 3 independent experiments is shown.

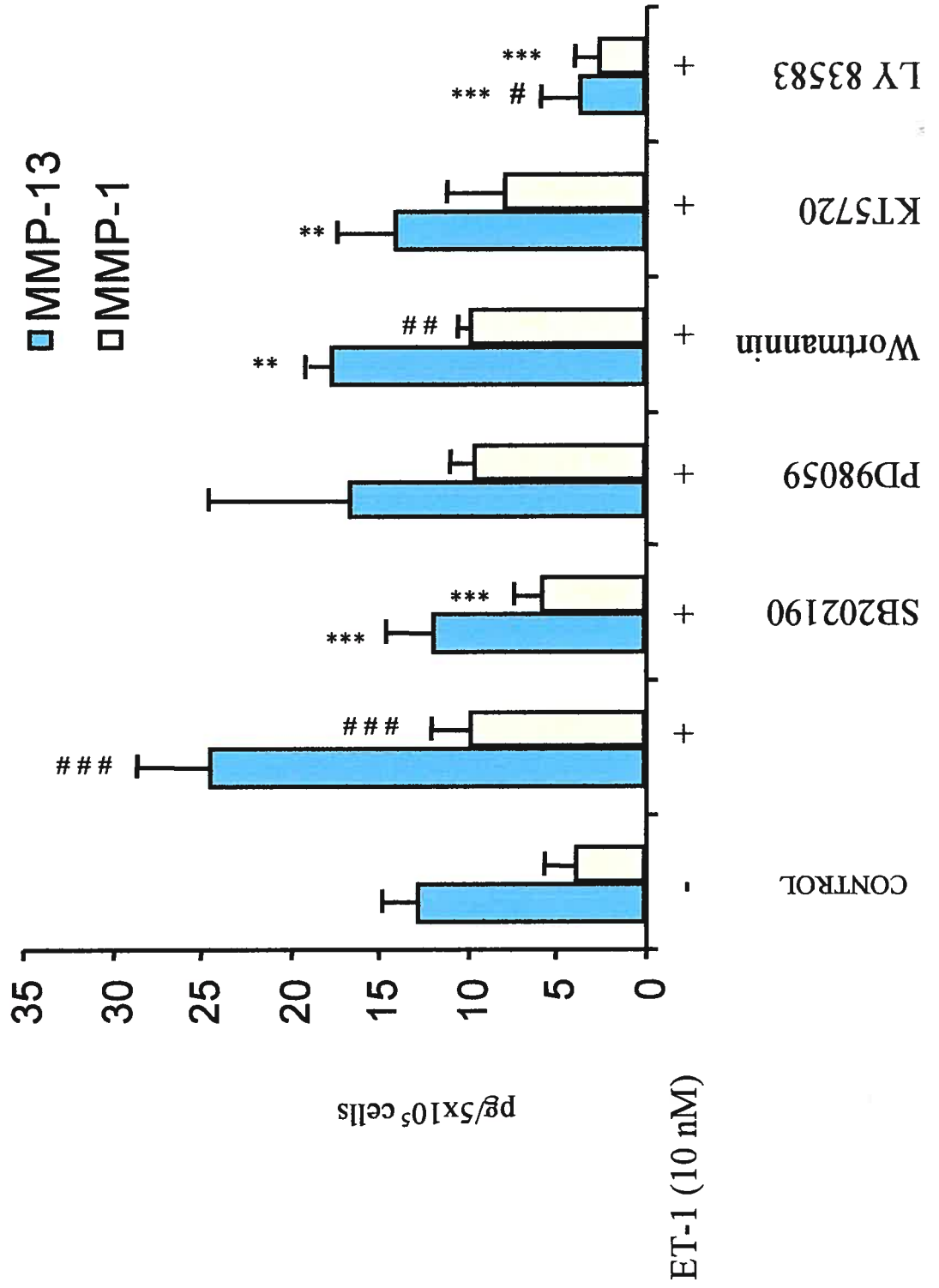


Fig 1

Fig 2

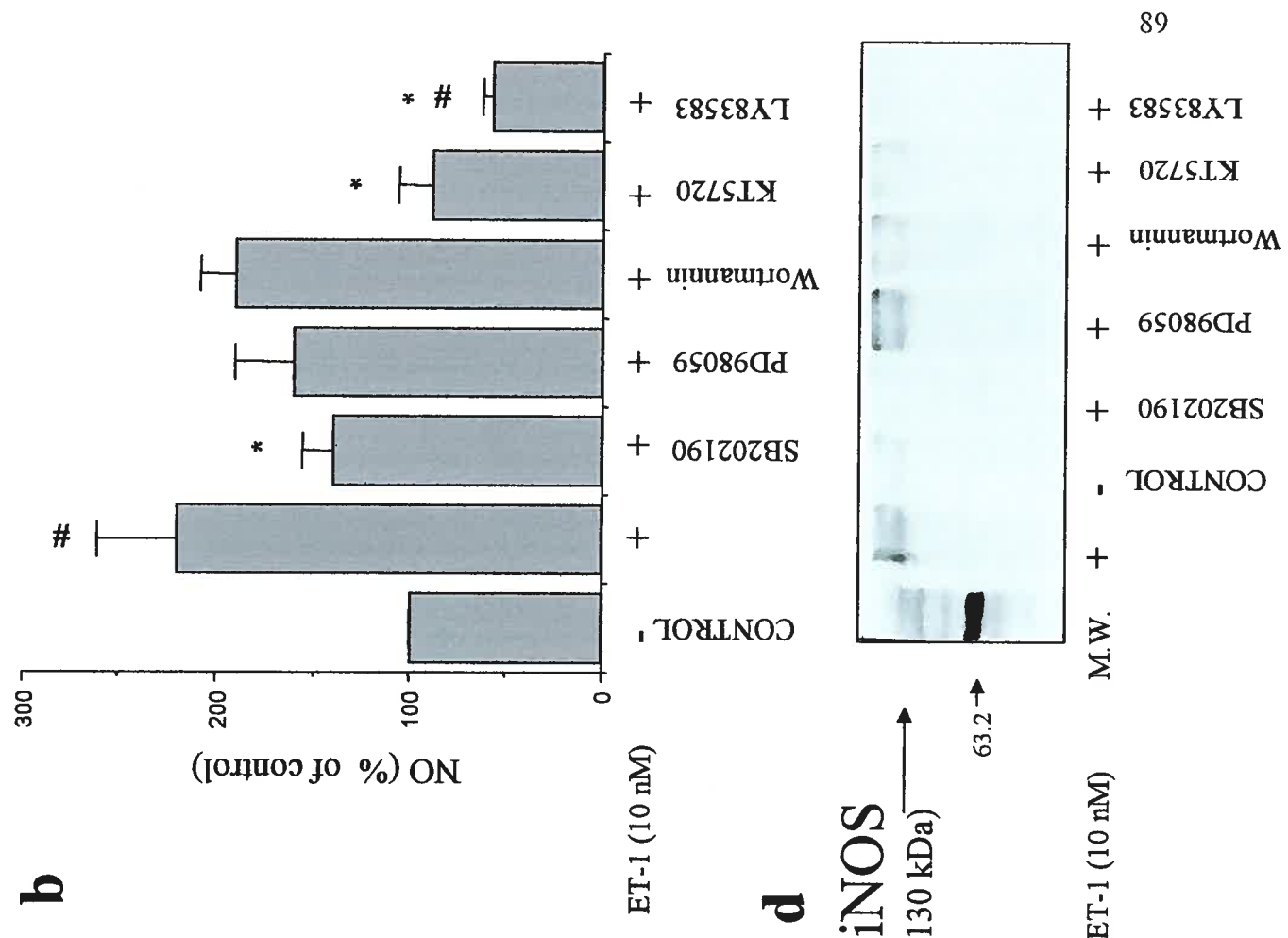
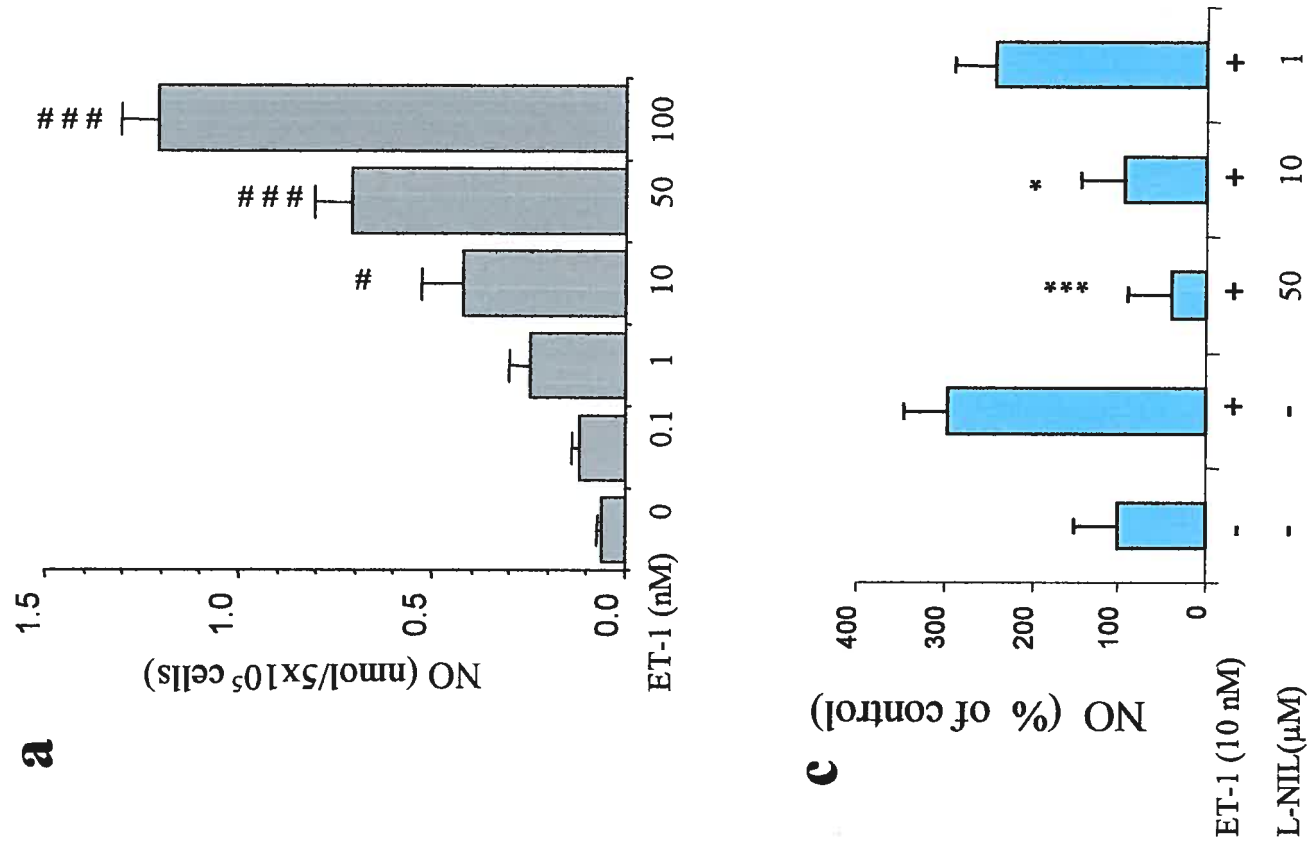
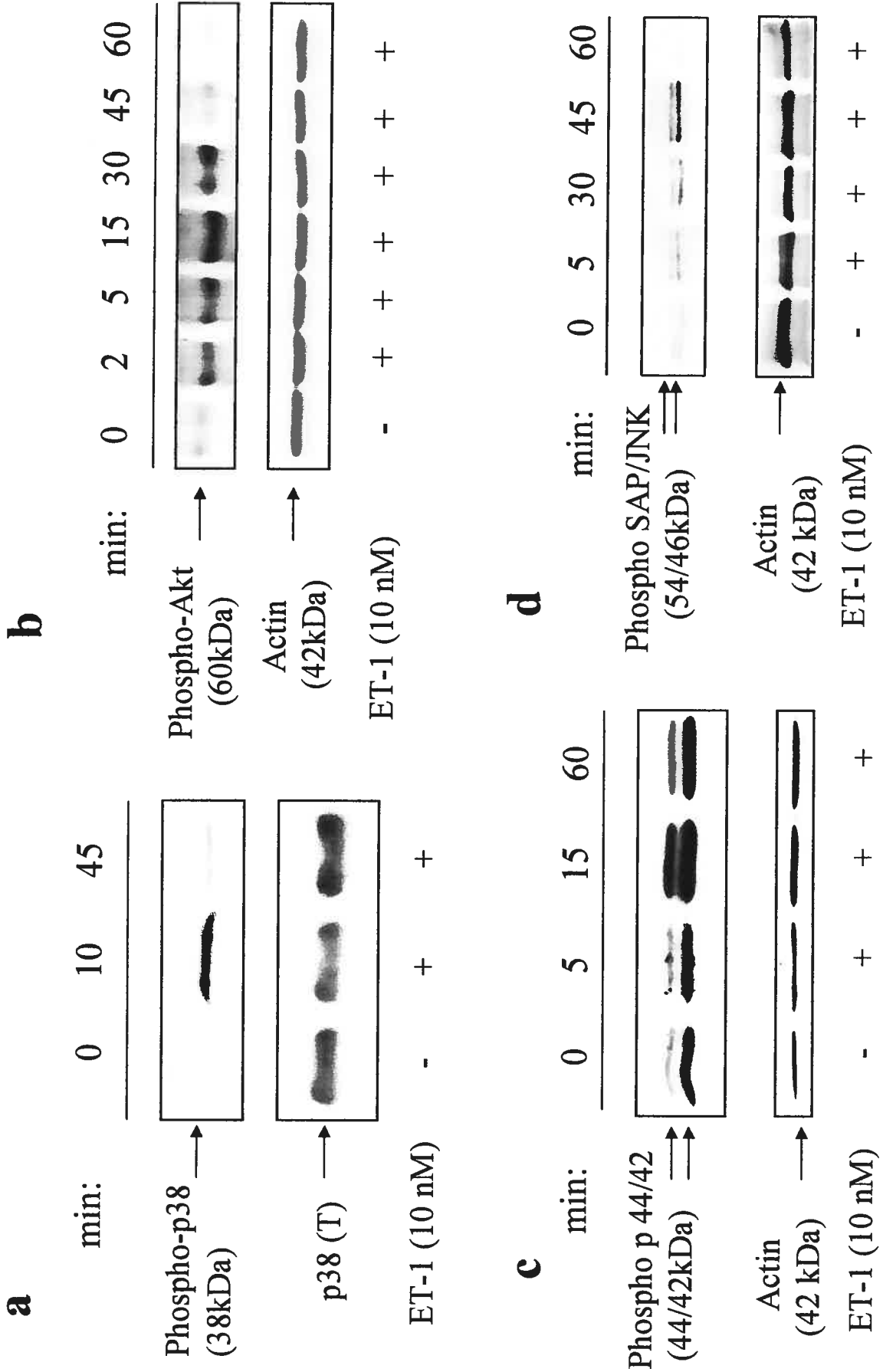


Fig 3



Reference List

1. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS: Etiopathogenesis of osteoarthritis. In *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. Edited by Koopman WJ, editor. Baltimore: Williams & Wilkins; 2001:2195-2245.
2. Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, M'Barek KN, Christgau S, Shipkolye F et al.: Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction . *Arthritis Rheum* 2003, 48:2855-2864.
3. Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Fiet J, Mitrovic DR: Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocyte culture . *Cytokine* 1997, 9:556-562.
4. Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Soliman H, Fiet J, Mitrovic DR: Endothelin 1 receptors, signal transduction and effects on DNA and proteoglycan synthesis in rat articular chondrocytes . *Cytokine* 1998, 10:669-679.
5. Stojilkovic SS, Catt KJ: Expression and signal transduction pathways of endothelin receptors in neuroendocrine cells . *Front Neuroendocrinol* 1996, 17:327-369.
6. Stojilkovic SS, Vukicevic S, Luyten FP: Calcium signaling in endothelin- and platelet-derived growth factor-stimulated chondrocytes . *J Bone Miner Res* 1994, 9:705-714.
7. Kinoshita A, Tamura T, Aoki C, Nakanishi T, Sobue S, Suzuki F et al.: Demonstration of endothelin (ET) receptors on cultured rabbit chondrocytes and

- stimulation of DNA synthesis and calcium influx by ET-1 via its receptors . *Cell Biol Int* 1995, 19:647-654.
8. Khatib AM, Ribault D, Quintero M, Barbara A, Fiet J, Mitrovic DR: The mechanism of inhibition of endothelin-1-induced stimulation of DNA synthesis in rat articular chondrocytes . *Mol Cell Endocrinol* 1997, 132:25-31.
 9. Khatib AM, Siegfried G, Messai H, Moldovan F, Mitrovic DR: Mechanism of inhibition of endothelin-1-stimulated proteoglycan and collagen synthesis in rat articular chondrocytes . *Cytokine* 2002, 17:254-261.
 10. Nagase H, Woessner JF, Jr.: Matrix metalloproteinases . *J Biol Chem* 1999, 274:21491-21494.
 11. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis . *J Clin Invest* 1996, 97:2011-2019.
 12. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ et al.: Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage . *J Clin Invest* 1996, 97:761-768.
 13. Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD, Evans CH: Nitric oxide in osteoarthritis . *Osteoarthritis Cartilage* 1999, 7:377-379.
 14. Gassner RJ, Buckley MJ, Studer RK, Evans CH, Agarwal S: Interaction of strain and interleukin-1 in articular cartilage: effects on proteoglycan synthesis in chondrocytes . *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000, 29:389-394.

15. Murrell GA, Jang D, Williams RJ: Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage . *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 206:15-21.
16. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG et al.: Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase . *Arthritis Rheum* 1998, 41:1275-1286.
17. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data . *J Bone Joint Surg Am* 1971, 53:523-537.
18. Gemba T, Valbracht J, Alsalameh S, Lotz M: Focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinases are involved in chondrocyte activation by the 29-kDa amino-terminal fibronectin fragment . *J Biol Chem* 2002, 277:907-911.
19. Khatib AM, Siegfried G, Quintero M, Mitrovic DR: The mechanism of inhibition of DNA synthesis in articular chondrocytes from young and old rats by nitric oxide . *Nitric Oxide* 1997, 1:218-225.
20. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids . *Anal Biochem* 1982, 126:131-138.
21. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta . *Arthritis Rheum* 1997, 40:1653-1661.

22. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18 . *Arthritis Rheum* 1999, 42:1577-1587.
23. Mulsch A, Busse R, Liebau S, Forstermann U: LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase . *J Pharmacol Exp Ther* 1988, 247:283-288.
24. LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP et al.: Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci . *Arthritis Rheum* 2001, 44:2078-2083.
25. Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP: Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis . *Lab Invest* 1994, 70:807-815.
26. Didier N, Romero IA, Creminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A: Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability . *J Neurochem* 2003, 86:246-254.
27. Messai H, Khatib AM, Lebrun G, Aubin P, Florina M, Jean F et al.: Endothelin-1 in monolayer cultures of articular chondrocytes from young and old rats: regulation by growth factors and cytokines . *Mech Ageing Dev* 2000, 114:37-48.

28. Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H et al.: Inducible NO synthase: role in cellular signalling . *J Exp Biol* 1999, 202 (Pt 6):645-653.
29. Aigner T, Kim HA: Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration . *Arthritis Rheum* 2002, 46:1986-1996.
30. Pfeilschifter J: Nitric oxide triggers the expression of proinflammatory and protective gene products in mesangial cells and the inflamed glomerulus . *Nephrol Dial Transplant* 2002, 17:347-348.
31. Khatib AM, Siegfried G, Messai H, Quintero M, Barbara A, Mitrovic RD: Basal and induced nitric oxide and cGMP productions are decreased in senescent cultured rat articular chondrocytes . *Mech Ageing Dev* 1998, 101:21-32.
32. Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Geng C, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: Collagenase 3 production by human osteoarthritic chondrocytes in response to growth factors and cytokines is a function of the physiologic state of the cells . *Arthritis Rheum* 1999, 42:1147-1158.
33. Windischhofer W, Zach D, Fauler G, Raspotnig G, Kofeler H, Leis HJ: Involvement of Rho and p38 MAPK in endothelin-1-induced expression of PGHS-2 mRNA in osteoblast-like cells . *J Bone Miner Res* 2002, 17:1774-1784.
34. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Majalahti-Palviainen T, Vuolteenaho O, Ruskoaho H: Endothelin-1-specific activation of B-type natriuretic peptide gene via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear ETS factors . *J Biol Chem* 2003, 278:3969-3975.

35. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE: Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3 . *Arthritis Rheum* 2000, 43:801-811.
36. Koide M, Kawahara Y, Nakayama I, Tsuda T, Yokoyama M: Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines . *J Biol Chem* 1993, 268:24959-24966.
37. Oddis CV, Simmons RL, Hattler BG, Finkel MS: Protein kinase A activation is required for IL-1-induced nitric oxide production by cardiac myocytes . *Am J Physiol* 1996, 271:C429-C434.
38. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M et al.: IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages . *J Immunol* 1998, 160:3513-3521.
39. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide . *Am J Pathol* 1995, 146:75-85.
40. Mitrovic D, Quintero M, Stankovic A, Ryckewaert A: Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces . *Lab Invest* 1983, 49:309-316.

CHAPITRE V: DISCUSSION

Les résultats de cette étude montrent que l'endothéline-1 induit la production de l'oxyde nitrique et des métalloprotéases MMP-1 et MMP-13. Dans l'ensemble, ce travail vient de confirmer et de compléter des résultats obtenus dans notre laboratoire et publiés récemment (Roy-Beaudry et al., 2003). Ces résultats ont montré que lors de l'arthrose une surproduction de l'ET-1 est observée. Nous avons démontré que l'ET-1 induit la synthèse, la sécrétion et l'activation des MMP-1 et MMP-13, qui favorise la dégradation du collagène de type II. De plus, nous avons caractérisé le mécanisme d'action de l'ET-1 dans l'induction de la production d'oxyde nitrique et des MMP-1 et -13 dans les chondrocytes articulaires arthrosiques. Nous avons eu recours à deux approches afin de caractériser le mécanisme potentiel d'action de l'ET-1 : 1) nous avons analysé la phosphorylation de certaines protéines kinases impliquées dans l'induction de la MMP-1 et -13 et du NO par l'ET-1 et 2) nous avons exploré l'effet des inhibiteurs pharmacologiques de ces voies de signalisation.

L'arthrose est caractérisée par un métabolisme chondrocytaire altéré, avec une dégradation excessive des macromolécules de la matrice extracellulaire. Plusieurs facteurs sont impliqués dans ce dysfonctionnement métabolique de l'arthrose, parmi lesquels plusieurs enzymes protéolytiques et d'autres agents cataboliques, tel que l'oxyde nitrique (Martel-Pelletier et al., 1994; Studer et al., 1999), l'IL1 β et le TNF α . D'après nos résultats, à ces facteurs cataboliques bien identifiés dans la littérature, s'ajoute maintenant l'ET-1. L'ET-1 apparaît être un facteur ayant des propriétés pro-inflammatoires puisqu'il induit la phosphorylation des protéines kinases connues pour leur implication dans l'inflammation. L'ET-1 induit également la synthèse d'iNOS qui produit du NO, un médiateur qui assume la vasodilatation lors de l'inflammation. Dans

le cartilage, il n'y a pas de cellules inflammatoires, puisque le cartilage est constitué d'un seul type cellulaire : les chondrocytes. L'inflammation dans l'arthrose est secondaire, elle apparaît au niveau de la membrane synoviale où l'ET-1 a été retrouvé (Miyasaka et al., 1992; Roy-Beaudry et al., 2003) et où elle semble jouer un rôle dans la douleur inflammatoire. Plusieurs études ont montré l'implication de l'ET-1 dans l'inflammation et la douleur. L'endothéline a des effets nociceptifs dans l'articulation, induisant la douleur articulaire via l'activation du récepteur ET_A (De-Melo et al., 1998). D'après nos résultats, l'ET-1 ne semble pas produire d'effet sur le NO et les MMP-1 et MMP-13 via les mêmes voies de signalisation. Tel que supposé, le NO est produit via l'induction de l'iNOS et implique la voie de la PKA et de la p38. La voie de l'IP3 n'est pas impliquée dans la production du NO, ni de la MMP-1, alors que la production de la MMP-13 implique cette voie.

Dans ce travail, nous n'avons pas exploré le type de récepteurs via lequel l'ET-1 agit. Il est possible que dans les chondrocytes articulaires le récepteur ne soit pas le même. Il est connu que les chondrocytes expriment les deux types de récepteurs (ETA et ETB), avec une prédominance du récepteur ET_A (Khatib et al., 1998) ce qui a été démontré dans les chondrocytes isolés des articulations de rats. Il semblerait que l'ET-1 induit la production des MMP via le récepteur ET_A et que la production de NO s'effectuerait via le récepteur ET_B. Récemment, il a été montré, dans le cancer ovarien, le sarcome de Kaposi et les fibroblastes que l'augmentation des niveaux de MMP par l'ET-1 se fait via le récepteur ET_A (Rosano et al., 2003) alors que nous savons depuis plusieurs années que la production du NO est effectuée par l'ET-1 suite à sa liaison au récepteurs ET_B (Hirata et al., 1993).

Les résultats de ce travail ont montré par ELISA que l'ET-1 induit la production des MMP-1 et MMP-13 et du NO. L'incubation des chondrocytes arthrosiques avec 10 nM d'ET-1 a presque doublé la production des collagénases et a multipliée par 5 à 6 fois celle du NO (tel que dans la figure 2a de l'article). De plus, l'incubation des chondrocytes avec des concentrations croissantes d'ET-1 (de 0,1 nM à 100 nM) a augmenté la production de NO de manière concentration-dépendante. Les effets de l'ET-1 sur la production de la MMP-1 et de la MMP-13, ainsi que sur l'expression de l'iNOS, et la production subséquente de NO peut interférer avec la voie de l'interleukine-1. Dans cette étude, nous n'avons pas étudié les effets possibles de synergie entre l'IL-1 β , mais quelques résultats préliminaires (non inclus dans ce travail) suggèrent l'existence d'une synergie entre l'endothéline-1 et l'IL-1 β . Cette synergie serait le résultat d'une interaction moléculaire très complexe parce que d'une part, il a été démontré que l'ET-1 module l'IL-1 β (Didier et al., 2003) et d'autre part, que les cytokines pro-inflammatoires sont capables d'augmenter l'expression de l'ET-1 (Khatib et al., 1997b). Des études additionnelles pour clarifier la relation entre ET-1 et IL-1 β seront nécessaires.

Les doses de l'ET-1 que nous avons utilisées dans cette étude, ont été choisi selon nos résultats précédemment publié (RoyBeaudry et al., 2003, Khatib et al., 1998, Messai et al., 1999) et sur de nombreuses travaux existant dans la littérature (étude *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal). Les doses de l'ET-1 utilisées sont largement plus élevées que les taux de l'ET-1 mesurées dans le liquide synovial des patients souffrant des maladies arthritiques. Dans la littérature, les taux d'ET-1 détectés dans la liquide synovial humain sont de $2,6 \pm 0,3$ pg/ml (Nahir et al., 1991) à $15,53 \pm 2,82$ pg/ml (Haq et al.,

1990). Dans les chondrocytes normaux de rats, nous avons détecté des taux d'ET-1 à l'état basal se situant autour de 10 pg/ml, alors que, lorsque ces cellules ont été exposées aux cytokines pro-inflammatoires, les taux de l'ET-1 sont augmentés de 4-10 fois dépendamment du stimulateur utilisée (Khatib et al., 1997b). De plus, dans les chondrocytes provenant d'animaux âgés, les taux de l'ET-1 et le nombre de récepteurs ET_A et ET_B sont davantage augmentés (Messai et al., 1999). La production augmentée de l'ET-1 détectée chez les patients arthrosiques peut être due au vieillissement (nos chondrocytes proviennent de patients âgés de 58 ± 6 ans) ainsi qu'à l'induction du gène de l'ET-1 par les cytokines pro inflammatoires (lors de l'arthrose on observe une hyperproduction des cytokines, surtout de l'IL-1 β et du TNF- α).

Notre étude apporte une meilleure connaissance des voies de signalisation qui sont impliquées dans la production de la MMP-1 et MMP-13 et de l'oxyde nitrique. Ce travail est le premier à explorer cette problématique dans les chondrocytes humains arthrosiques. À l'aide des inhibiteurs spécifiques des différentes voies de protéines kinases et de guanylate cyclase, nous avons caractérisé les voies majeures par lesquelles l'action de l'ET-1 dans les chondrocytes OA s'effectue. Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par d'autres études dans lesquelles les MMP-1 et MMP-13 ont été explorées en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Dans les chondrocytes articulaires, l'action des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α sur l'induction de la production de la MMP-1 et de la MMP-13 exige l'activation de la p38 MAPK (Mengshol et al., 2000). Dans notre travail, nous avons montré que l'ET-1 induit également la phosphorylation de la p38. De même, l'activation de la p38 MAPK par l'ET-1 a été décrite dans les myocytes cardiaques produisant le facteur natriurétique

de type B (Pikkarainen et al, 2003), dans les ostéoblastes qui exprimaient spécifiquement les ARN messagers de la prostaglandine H synthétase de type 2 (Windischhofer et al., 2002), dans les fibroblastes cardiaques (Cheng et al., 2003) et dans l'aorte de rat (Kwon et al., 2003). Dans cette étude, nous avons de plus démontré par ELISA que l'inhibiteur de p38 MAPK, le SB202190, a supprimé complètement la production des deux métalloprotéases. Les autres inhibiteurs des protéines kinases n'ont pas montré d'effet supprimeur sur la production des MMP-1, mais ils ont diminué partiellement le niveau de MMP-13. Dans les chondrocytes arthrosiques, il semble donc que l'ET-1 induit la production de ces deux métalloprotéases par l'activation de la p38 MAPK. L'inhibition de la p38 MAP kinase agit sur l'induction de la production des MMP-1 et MMP-13 par l'ET-1, cependant la p38 MAPK n'a pas d'effet sur le niveau basal des MMP-1 et MMP-13.

Dans ce travail, nous avons observé des différences subtiles quant à l'inhibition de la production des MMP-1 et MMP-13 induites par l'ET-1 suggérant la possibilité que les voies de signalisation sont différentes pour chacune de ces deux métalloprotéases. L'activation de la PKA est sollicitée pour la stimulation de l'iNOS et par la suite pour la production de NO par quelques cellules telles que les cellules vasculaires lisses (Koide et al., 1993), les myocytes cardiaques (Oddis et al., 1996) et les macrophages humains (Jovanovic et al., 1998). Dans les chondrocytes ostéoarthritiques, la PKA est impliquée dans la production de NO induite par les cytokines pro-inflammatoires (Blanco et al., 1995). Nos résultats suggèrent fortement que, dans les chondrocytes arthrosiques humains, l'activation de la PKA est requise pour la régulation de l'iNOS induite par l'ET-1. Nous avons montré par ELISA que la production de NO induite par

l'ET-1 a été supprimée complètement par le KT5720, l'inhibiteur de protéine kinase A et, diminuée significativement par l'inhibiteur de p38 MAPK. Les autres inhibiteurs n'ont pas montré d'effet significatif. De la même façon que pour les collagénases, l'inhibition de la PKA et de la p38 MAPK est distinctive pour l'induction de la production du NO par ET-1 puisque ces inhibiteurs n'ont pas d'effet sur le niveau basal du NO.

Dans cette étude, nous avons obtenu des effets d'inhibition sur la production des MMP et du NO lorsque les chondrocytes ont été exposés à l'inhibiteur de guanylate cyclase, LY83583. Cette molécule a été le plus puissant inhibiteur de la production de ces deux métalloprotéases et aussi du NO parmi ceux utilisés. Elle a supprimé presque complètement leur production. L'inhibiteur LY83583 n'est pas distinctif pour la production des MMP-1 et MMP-13 et du NO induite par l'ET-1, car l'inhibition qu'il provoque affecte aussi leur niveau basal et pas seulement leur production induite par l'ET-1. Le LY83583 est connu comme un inhibiteur de la production de GMPc dépendante de NO (Mulsch et al., 1998).

Dans des modèles expérimentaux d'arthrose chez l'animal, l'inhibition sélective de l'iNOS synthase par le L-NIL protège l'articulation arthrosique (Pelletier et al., 1998). Dans notre travail, nous avons observé par la réaction de Griess que la production de NO induite par l'ET-1 a été presque complètement inhibée par 50 μ M de L-NIL. Par Western Blot, nous avons mis en évidence l'induction de l'iNOS après une stimulation de 24 heures avec 10 nM de ET-1. Alors, tel que supposé, l'ET-1 induit la production d'oxyde nitrique via l'iNOS et de plus, nous démontrons que les différents inhibiteurs testés (SB 202190, KT5720 et LY83583) ont un effet d'inhibition sur la iNOS. Le

Wortmannin ne semble pas avoir d'effet sur la production de NO, alors qu'il semble avoir un effet faible sur la synthèse de iNOS. Dans la littérature, des résultats similaires ont été trouvés : dans Gemba et al.(2002), le Wortmannin n'inhibe pas la production de NO, dans Salh et al.(1998), le Wortmannin n'a pas d'effet sur la production de NO et dans Jang et al.(2004), le Wortmannin inhibe la production de iNOS. L'inhibiteur PD 98059 (à la concentration employée de 10 μ M) n'a pas d'effet inhibiteur sur l'iNOS ou la production du NO. Il est possible que la concentration utilisée soit faible, cependant dans la littérature, cette concentration (10 μ M) est suffisante pour la suppression du NO inducible (Gemba et al., 2002)

Dans ce travail, nous avons examiné l'effet de l'ET-1 sur la phosphorylation des protéines kinases p38 MAPK, p44/42, SAP/JNK et Akt. La phospho-p38 a été phosphorylée après 10 minutes d'incubation avec 10 nM d'ET-1. L'Akt a été phosphorylée après 2 minutes et cet effet a persisté pendant 30 minutes, suivi par une inhibition à 45 minutes. À 45 minutes, les formes phosphorylés de ces deux kinases (p38 et Akt) ont été diminuées. L'effet maximal a été obtenu pour p44/42 kinase à 15 minutes et pour SAP/JNK à 45 minutes. La forme phosphorylée de SAP/JNK n'a pas été détectée à 60 minutes. Quand à la forme phosphorylée de p44/42, elle diminue, mais elle est encore présente à 60 minutes. Par Western Blot, nous avons détecté la phospho-Akt à partir des 2 minutes d'incubation des chondrocytes en présence de 10 nM d'ET-1. L'activation des ces kinases apparaît nécessaire pour la production des MMP-1 et MMP-13 induite par l'ET-1, puisque leur inhibition pharmacologique (par les différents inhibiteurs), diminue les niveaux détectables dans le milieu de culture.

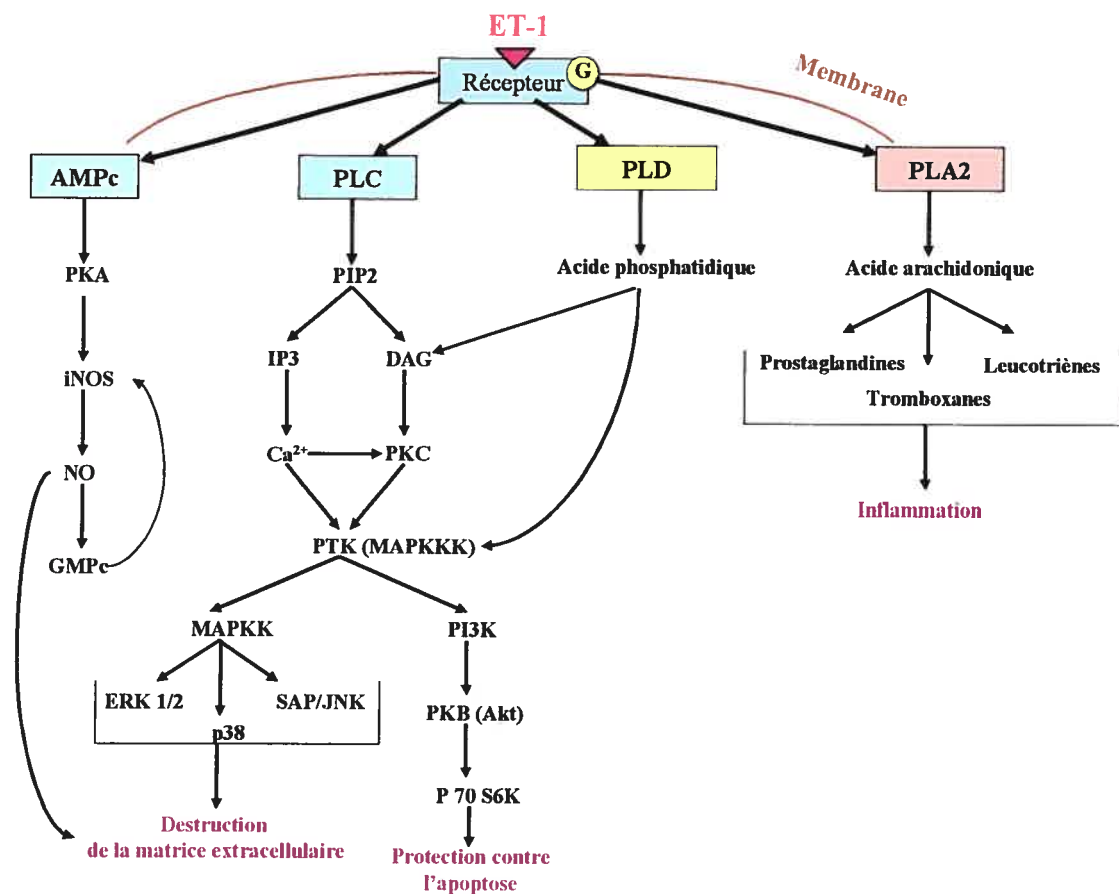
Il est connu qu'à des niveaux physiologiques, l'oxyde nitrique est une molécule importante dans la signalisation cellulaire (Beck et al., 1999), tandis qu'à des concentrations élevées, le NO est toxique pour les cellules, induisant l'apoptose et la mort cellulaire dans les chondrocytes articulaires (Aigner et al., 2002). L'excès de NO est cytotoxique pour les cellules, car le NO produit le peroxy-nitrite et les radicaux d'hydroxyle qui induisent la peroxydation des lipides et détruisent les molécules, comme l'ADN. Le résultat final de ces changements est l'inhibition de plusieurs processus cellulaires qui donne une incapacité des cellules à synthétiser les molécules de la matrice cellulaire et à réparer les tissus endommagés (Khatib et al., 1997a).

Puisque nous savons qu'un excès de NO induit l'apoptose et la mort cellulaire dans les chondrocytes articulaires (Aigner et al., 2002), nous avons testé l'hypothèse que l'ET-1 peut aussi induire l'apoptose et la mort chondrocytaire. La mort chondrocytaire peut être un des facteurs qui contribuent à la destruction du cartilage. La plupart des cellules de la zone superficielle du cartilage disparaissent au cours de la dégénération du cartilage (Mitrovic et al., 1983), et de plus, nous avons récemment démontré que, lors de l'arthrose, l'ET-1 est produit principalement dans la zone superficielle du cartilage (Roy-Beaudry et al., 2003). Cependant, la présente étude montre que l'ET-1 n'a pas d'effet sur l'apoptose et sur la mort cellulaire des chondrocytes arthrosiques. En utilisant la technique TUNEL, technique capable de détecter l'apoptose et la mort cellulaire (Aigner et al., 2002), nous n'avons pas observé de différence entre les cellules contrôle et celles qui ont été exposées pendant 72 heures à l'ET-1 (10 nM). Des résultats semblables ont été obtenus avec des techniques d'immunocytochimie, en investiguant la protéine pro-apoptotique Bad et la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Il

semble que l'ET-1 n'induit pas la production de ces protéines, car le nombre des cellules positives ne diffère pas significativement dans les cultures traitées avec l'ET-1 par rapport aux cultures contrôle. Fait intéressant, un nombre plus important des chondrocytes expriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (42.8 ± 5.1 and 43.2 ± 4.3 % pour le contrôle et pour l' ET-1 respectivement) par rapport à la protéine anti-apoptotique Bad ($10.1 \pm 3.8\%$ and $9.5 \pm 2.1\%$ pour le contrôle et pour l' ET-1 respectivement) (Bad versus Bcl2, $P < 0.005$). Ceci indique que les cellules n'entrent pas dans le processus pro-apoptotique. Ainsi, le ratio Bcl-2/Bad reste identique dans le cartilage contrôle et le cartilage traité avec l'ET-1, suggérant que l'ET-1 ne module pas la présence des protéines apoptotiques Bcl-2 et Bad. Puisque l'Akt est phosphorylée dans les chondrocytes stimulés à l'endothéline, l'Akt pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules contre le processus apoptotique. D'ailleurs, il a été récemment suggéré que la voie de l'Akt peut être impliquée dans le contrôle de la survie cellulaire (Del Bufalo et al., 2002)

Figure 1 - Mécanisme d'action de l'ET-1

L'ET-1 joue un rôle dans la destruction du cartilage via le NO et les MAPK, ainsi que dans l'inflammation via l'acide arachidonique. L'ET-1 semble également avoir une influence protectrice contre l'apoptose via l'Akt.



**CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES**

1. Conclusions

Les résultats de notre étude indiquent qu'il est raisonnable d'attribuer à l'endothéline-1 un rôle important dans la pathophysiologie de l'arthrose humaine en tant que facteur favorisant le catabolisme du cartilage arthrosique via l'induction de la production des facteurs qui dégradent le cartilage, tels que les collagénases et l'oxyde nitrique.

Ce travail permet d'approfondir les connaissances dans un domaine médical prioritaire pour notre société vieillissante. L'arthrose est une des maladies chroniques les plus fréquentes et dont le traitement est basé sur le soulagement des symptômes et sur le remplacement chirurgical de l'articulation par prothèse. À ce jour, aucun traitement efficace qui puisse arrêter la progression de la maladie n'est disponible.

Nos résultats contribuent à mieux comprendre le rôle de l'ET-1 dans l'arthrose. Nous avons démontré que l'ET-1 induit la production des MMP-1 et MMP-13 qui sont directement responsable du clivage du collagène de type II. Ainsi, nous avons montré que l'ET-1 induit la production du NO, un facteur catabolique impliqué dans la dégradation de la matrice extracellulaire. L'ET-1 a donc des actions cataboliques dans les chondrocytes articulaires des patients arthrosiques et pourrait constituer une cible thérapeutique dans le traitement qui vise à arrêter les altérations structurales du cartilage. Grâce aux données obtenues dans cette étude, nous pourrions envisager l'utilisation des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 in vivo dans l'arthrose expérimentale, pour réduire directement les effets de ce peptide.

De plus, en utilisant des inhibiteurs spécifiques, nous avons identifié les voies de signalisation empruntées par l'ET-1 pour contrôler la production du NO, de la MMP-1

et de la MMP-13. Ces résultats nous permettrons d'envisager l'utilisation d'inhibiteurs de guanylate cyclase et de protéine kinases comme des nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'arthrose. Par exemple, puisque la voie de p38 kinase est impliquée dans l'induction des MMP-1 et MMP-13 par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β , ainsi que par l'ET-1, cette voie de signalisation peut devenir une cible pour des futures thérapies visant à arrêter la dégradation du cartilage. En conclusion, ce mémoire apporte une meilleure connaissance des voies de signalisations activées par l'endothéline-1 dans les chondrocytes provenant de patients qui souffrent de l'arthrose du genoux.

2. Perspectives

2.1. Analyser la synergie possible entre l'ET-1 et l'IL-1 β

Une des voies de recherche pour poursuivre le présent travail est de déterminer l'existence des interactions entre l'ET-1 et les autres cytokines pro inflammatoires prototypes de la dégradation lors de l'arthrose, tel que l'IL-1 β . Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire (non inclus dans ce travail) ont suggéré une synergie entre l'endothéline-1 et l'IL-1 β (un effet additionnel a été observé pour l'induction du NO). Les cytokines pro inflammatoires sont capables d'augmenter l'expression de l'ET-1 et l'ET-1 peut moduler l'IL-1 β . Des études additionnelles pour clarifier la relation très complexe entre ses différents médiateurs semblent nécessaires.

2.2. Un rôle possible des MMP : la génération de l'ET-1 [1-32]

La capacité des MMP à cliver la Big ET-1 et à induire ainsi la maturation de l'ET-1 pourrait être une autre voie à explorer. En effet, l'ET-1 se trouve sous forme mature dans le microenvironnement articulaire dans lequel les MMP et la Big ET-1 se trouvent augmentés lors de l'arthrose. Récemment, Fernandez-Patron, *et al.* (2001) ont montré que les gélatinases clivent la Big ET-1 entre le Gly³² et Lys³³ en générant une nouvelle forme très active de l'ET-1 constituée de 32 acides aminés, l'ET-1[1-32]. Un autre travail a démontré que les chymases sont capables de cliver la Big ET-1 et qu'elles génèrent une ET-1 constituée de 31 acides aminés. Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont mis en évidence un clivage de la Big ET-1 causé par la MMP-3 et l'induction de la synthèse MMP-3 par l'ET-1 et ce de manière dose dépendante. Ces résultats nous incitent à croire qu'il existe une boucle de régulation autocrine et paracrine dans les tissus des articulations pathologiques et des études ultérieures devraient être effectuées afin de clarifier la signification des interactions.

2.3. Rôle de l'ET-1 dans la douleur inflammatoire

Une troisième voie intéressante pour le rôle de l'ET-1 dans l'arthrose est le fait qu'elle pourrait causer la douleur inflammatoire. Un grand nombre de médiateurs chimiques jouent un rôle dans l'induction, la transmission et la modulation des messages nociceptifs parmi lesquels les prostaglandines, la bradykinine, les cytokines pro inflammatoires, l'oxyde nitrique et récemment suggéré l'ET-1.

Des études ont montré l'implication de l'ET-1 dans l'inflammation et la douleur inflammatoire chez le rat. Les effets nociceptives de l'ET-1 dans l'articulation,

semblent se produire via l'activation du récepteur ET_A . L'effet de l'ET-1 et des antagonistes des deux récepteurs de l'ET-1 devrait être exploré dans des modèles animaux. Un modèle intéressant d'arthrose avec lequel notre laboratoire a récemment travaillé est la souris STR/ort qui est une souris prédisposée génétiquement au développement de l'OA. Ce modèle est très intéressant pour les études qui visent à déterminer le rôle des facteurs précoces de l'arthrose, et est basé sur les résultats publiés dans Roy-Beaudry et al. (année). Nous suspectons que l'ET-1 soit impliquée très précocement : l'ET-1, cause la fragmentation des néoépitopes de collagène de type II, qui reste partiellement attaché à la matrice en début de l'arthrose et en absence des contraintes mécaniques. Au fur et à mesure que la maladie progresse, sous le contrôle des contraintes mécaniques, une perte des protéoglycanes est observé. Ses fragments de collagène de type II se libèrent. Ceci nous incite aussi à réfléchir sur le rôle possible de l'ET-1 en tant que marqueur des stades précoces des altérations du cartilage. Afin d'explorer cette possibilité, il est impératif d'avoir accès aux tissu correspondant aux stades précoce de la maladie (Mankin 1-3) et non seulement au cartilage provenant des arthroplasties (stades terminal de la maladie). Cette limite pourrait être contournée en utilisant le modèle de souris arthrosique STR/ort.

Un autre modèle animal intéressant pour poursuivre les analyses du rôle de l'ET-1 dans l'articulation est la souris transgénique sur exprimant l'ET-1. Dans la littérature, les souris transgéniques qui sur expriment l'ET-1 (Amiri et al., 2004; Schwartz et al., 2002; Shindo et al., 2002; Hocher et al., 1997) ne montrent pas un phénotype d'hypertension artérielle, mais plutôt des changements structuraux de fibrose et d'inflammation rénale. Une souris transgénique surexprimant l'ET-1 dans

l'endothélium vasculaire a été développé récemment (Schiffrin et al., 2003), mais les changements articulaires n'ont pas été investigués jusqu'à présent. Fait intéressant, les souris déficientes pour le récepteur ET_A de l'ET montre un phénotype de syndrome de déformations cranio-faciales et d'hypoplasie mandibulaire (Clouthier et al., 1998).

CHAPITRE VII: RÉFÉRENCES

Adams CS and Horton WE 1998 Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec* 250: 418-425

Adams JL, Badger AM, Kumar S, Lee JC, 2001 P38 MAP kinase : molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines. *Prog. Med. Chem.* 38: 1-60

Aigner T, Kim HA. 2002 Apoptosis and cellular vitality : issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 46(8) : 1986-1996

Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MAJ, Rittenhouse SE. 1985 Angiotensin increases inositol triphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension* 7 : 447-451

Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshal PJ, Rediske J. 1997 Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest* 99 : 1231-1237

Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah N, Touyz R, Reudelhuber T, Schiffrin E. 2004 Endothelium-Restricted Overexpression of Human Endothelin-1 Causes Vascular Remodeling and Endothelial Dysfunction. *Circulation* 110: 2233-2240

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S 1990 Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*;348:730-2

Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. 2001 Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor- α . *Journal of Orthopaedic Research* 19: 785-796

Aramori I, Nakanishi S. 1992 Coupling of two endothelin receptors subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 267: 12467-12474

Archer CW and Francis-West F. 2002 Cell in focus: The Chondrocyte. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35: 401-404

Arner EC 2002 Aggrecanase-mediated cartilage degradation. Current Opinion in Pharmacology 2: 322-329

Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. 1997 Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. Arthritis Rheum 40: 1050-1053

Avruch J, Zhang XF, Kyriakis. 1994 Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. Trends Biochem Sci 19: 279-283

Badger AM, Bradbeer B, Votta B, Lee JC, Adams JL, Griswold DE. 1996 Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. J Pharmacol Exp Ther. 279: 1453-1461

Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H et al. 1999 Inducible NO synthase: role in cellular signalling. J Exp Biol 202 (Pt6): 645-653

Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM. 1990 Receptor-effector coupling by G proteins. Biochim Biophys Acta; 1031:163-224

Bisotto S, Fixman ED. 2001 Src-family tyrosine kinases, phosphoinositide 3-kinase and Gab 1 regulate extracellular signal-regulated kinase 1 activation induced by type A endothelin-1 G-protein-coupled receptor. Biochem J 360: 77-85

Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R. 2002 Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. FEBS Lett. 524:43-48

Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. 1995 Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 146: 75-85

Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. 1998 Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 41: 284-289

Boissier MC. 1996 *Décisions en rhumatologie*. Éd. Vigot: 275

Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS. 1990 An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249(4964): 64-67

Brauchle M, Gluck D, Di Padova F, Han J, Gram H. 2000 Independent role of p38 and ERK1/2 mitogen-activated kinases in the up-regulation of matrix metalloproteinase-1. *Exp Cell Res* 258: 135-144

Brown EJ, Beal PA, Keith CT, Chen J. 1995 Control of p70S6 kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 377: 441-446

Campbell IK, Piccoli DS, Butler DM, Singleton DK, Hamilton JA. 1988 Recombinant human interleukin-1 stimulates human articular cartilage to undergo resorption and human chondrocytes to produce both tissue- and urokinase-type plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta*. 967(2): 183-194

Cao L, Lee V, Adams ME, Kiani C, Zhang Y, Hu W. 1999 Beta-integrin collagen interaction reduces chondrocytes apoptosis. *Matrix Biol* 18: 343-355

Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS. 1993 Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11419-11423

Chen YR, Tan TH. 1998 Inhibition of the c-jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 17: 173-178

Cheng CM, Hong HJ, Liu JC, Shih NL, Juan SH, Loh SH, Chan P, Chen JJ, Cheng TH. 2003 Crucial role of extracellular signal-regulated kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1 gene expression induced by endothelin-1 in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* 63(5): 1002-1011

Clark IM, Powel LK, Ramsey S, Hazelman BL, Cawston TE. 1993 The measurement of collagenases, tissue inhibitor of metalloproteases (TIMP), and collagenases-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 36: 372-379

Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. 1998 Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 125, 813-824

Cockcroft S and Thomas GMH. 1992 Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochemical Journal* 288: 1-14

Coker ML, Jolly JR, Joffs C, Etoh T, Holder JR, Bond BR, Spinale FG. 2001 Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H543-H551

Davis RJ. 2000 Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103(2): 239-252

Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF. 1989 Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 84: 678-685

Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Varmi M, Salani D, Rosano L, Triscioglio D, Spinella F, Bagnato A. 2002 Endothelin-1 Protects Ovarian Carcinoma Cells against Paclitaxel-Induced Apoptosis: Requirement for Akt Activation. *Mol. Pharmacol.* 61, 524-532.

De-Melo JD, Tonussi CR, D'Orléans-Juste P, Rae GA. 1998 Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naïve and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor agonists. *Pain* 77: 261-269

Diab M, Wu JJ, Eyre DR. 1996 Collagen type IX from human cartilage : a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem J* 314(Pt 1): 327-332

Didier N, Romero IA, Creminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. 2003 Secretion of interleukin-1 beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* 86(1): 246-254

Dietrich JB. 1997 Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family. *Arch Physiol Biochem* 105(2): 125-135

D'Orleans-Juste P., Plante M., Honore J.C., Carrier E., Labonte J. 2003 Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* Vol 81

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridres AJ, Saltiel AR. 1995 A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7686-7689

Eyre DR 1991 The collagen of articular cartilage 21(3 Suppl 2): 2-11

Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. 1992 Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 51: 1219-1222

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magdola RL, Scherle PA, Trzaskos JM. 1998 Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273: 18623-18632

Feelisch M and Noack EA. 1987 Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *J Pharmacol* 139: 19-30

Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G. 1989 Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol*, 13 Suppl 5: S220-S222.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. 1993 Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia *Br J Pharmacol* 110: 1227-1231

Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. 2002 Methods for analysis of matrix metalloproteinase regulation of neutrophil-endothelial cell adhesion.

Firestein GS, Paine MM, Littman BH. 1991 Gene expression (collagenases, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum* 34: 1094-1105

- Fisher SH. 1995 Homologous and heterologous regulation of receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis. *Eur J Pharmacol (Mol Pharmacol Section)* 288: 231-250
- Garrington TP and Johnson GL. 1999 Organisation and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Cell Biol* 11: 211-218
- Gassner RJ, Buckley MJ, Studer RK, Evans CH, Agarwal S. 2000 Interaction of strain and interleukin-1 in articular cartilage: effects on proteoglycan synthesis in chondrocytes. *Int J Oral Maxillofac Surg Oct*, 29(5): 389-394
- Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvo M, Wang SC. 1993 Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3491-3495
- Gemba T, Valbracht J, Alsalameh S, Lotz M. 2002 Focal adhesion kinase and mitogen activated protein kinases are involved in chondrocytes activation by the 29 kDa amino-terminal fibronectin fragment. *J Biol Chem* 277: 907-911
- Gingras AC, Kenedy SG, O'leary MA, Sonenberg N, Hay N. 1998 4E-BPI, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt (PKB) signaling pathway. *Genes Development* 12: 502-513
- Goldring MB. 2000 The rôle of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 1916-1926
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. 1997 Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. 74(2): 111-122
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982 Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126: 131-138

Griendling KK, Tsuda T, Berk BC, Alexander RW. 1989 Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 14: S27-33

Gutierrez S, Palacios I, Egado J, Gomez-Garre D, Hernandez P, Gonzalez E, Herrero-Beaumont G. 1996 Endothelin-1 induces loss of proteoglycans and enhances fibronectin and collagen production in cultured rabbit synovial cells. *Eur J Pharmacol*, 302: 191-197

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. 1994 A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265(5173): 808-811

Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS. 2001 C-jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108: 73-81

Haq A, El-Ramahi K, Al-Dalaan A, Al-Sedairy ST. 1999 Serum and synovial fluid concentrations of endothelin-1 in patients with rheumatoid arthritis. *J Med* 30: 51-60

Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. 1998a Linkage of chondrocytes apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41: 1632-1638

Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J. 1998b Chondrocyte – derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3094-3099

Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, Lotz M. 1997 Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 40: 1749-1755

Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. 1998c Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41: 1266-1274

Hauselmann HJ, Opplinger L, Michel BA, Stefanovic-Racic M, Evans CH. 1994 Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. *FEBS Lett* 352: 361-364

Hetts SW. 1998 To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279(4): 300-307

Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. 1993 Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91: 1367-1373

Hofer B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Burst V, Siegmund F, Bauer C, Neumayer H-H, Schleuning W-D. 1997 *J. Clin. Invest.* 99(6): 1380-1389

Hokin LE. 1985 Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Annual Review in Biochemistry* 54: 205

Ihling C, Szombathy T, Bohrmann B, Brockhaus M, Schaefer HE, Loeffler BM. 2001 Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*; 104:864-9

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K et al. 1989 The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2863-7

Jang B-C, Paik J-H, Kim S-P, Bae J-H, Mun K-C, Song D-K, Cho C-H, Shin D-H, Kwon T K, Park J-W, Lee SO, Suh S-I. 2004 Catalase induces the expression of

inducible nitric oxide synthase through activation of NF- κ B and PI3K signaling pathway in Raw 264.7 cells. *Biochemical Pharmacology* 68: 2167-2176

Jeffrey JE, Gregory DW, Aspden RM. 1995 Matrix damage and chondrocytes viability following a single impact load on articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 322: 87-96

Jovanovic D, Di Batista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. 1998 Interleukin-17 (IL-17) stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , by human macrophages. *J Immunol* 160: 3513-3521

Karin M. 1995 The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270: 16483-16486

Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. 1993 Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*; 268: 19126-33

Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB. 1997 Bad is a Bcl-2 domain – containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-x_L. *Molecular and Cellular Biology* 17: 7040-7046

Khatib AM, Ribault D, Quintero M, Barbara A, Fiet J, Mitrovic R. 1997a The mechanism of inhibition of endothelin-1-induced stimulation of DNA synthesis in rat articular chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 132: 25-31

Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Fiet J, Mitrovic DR. 1997b Constitutive and inducible expression of endothelin-1 in primary rat articular chondrocytes culture. *Cytokine* 9(8): 556-562

Khatib AM, Siegfried G, Quintero M, Mitrovic R. 1997c The mechanism of inhibition of DNA synthesis in articular chondrocytes from young and old rats by nitric oxide. Nitric oxide: Biology and Chemistry 1: 218-225

Khatib AM, Lomri A, Moldovan F, Soliman H, Fiet J, Mitrovic DR. 1998 Endothelin 1 receptors, signal transduction and effects on DNA and proteoglycan synthesis in rat articular chondrocytes. Cytokine 10: 669-679

Khatib AM, Messai H, Lebrun G, Moldovan F, Fiet J, Mitrovic RD. 1999 The production of endothelin-1 is increased in cultured articular chondrocytes from old rats. Regulation of the production by cytokines and growth factors. Mech Ageing Dev 114: 37-48

Khatib AM, Siegfried G, Messai H, Moldovan F, Mitrovic DR. 2002 Mechanism of inhibition of endothelin-1 stimulated proteoglycan and collagen synthesis in rat articular chondrocytes. Cytokine 17: 254-261

Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. 2000 Apoptotic chondrocytes death in human osteoarthritis. J Rheumatol 27: 455-462

Kimball ES, Persico FJ, Vaught JL. 1988 Neurokinin-induced generation of interleukin-1 in a macrofage cell line. Ann NY Acad Sci 540: 688-690

Kimball ES. 1990 Substance P, cytokines, and arthritis. Ann NY Acad Sci 594: 293-308

Kinoshita A, Tamura T, Aoki C, Nakanishi T, Sobue S, Suzuki F, Takahashi K, Takigawa M. 1995 Demonstration of endothelin (ET) receptors on cultured rabbit chondrocytes and stimulation of DNA synthesis and calcium influx by ET-1 via its receptors. Cell Biol Int 19: 647-654

Kodama H, Fukuda K, Takahashi E, Sano M. 2002 Role of EGF receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 34: 139-150

Koide M, Kawahara Y, Nakayama I, Tsuda T and Yokoyama M. 1993 Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 268: 24959-24966

Kouri-Flores JB, Abbud-Lozoya KA, Roja-Morales L. 2002 Kinetics of the ultrastructural changes in apoptotic chondrocytes from an osteoarthritis rat model: a window of comparison to the cellular mechanism of apoptosis in human chondrocytes. *Ultrastruct Pathol* 26: 33-40

Kuan NK, Passaro E. 1998 Apoptosis: programmed cell death. *Arch Surg* 133(7): 773-775

Kumar S, Boehm J, Lee JC. 2003 P38 MAP kinase: key signaling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature Reviews/Drug Discovery* 2: 717-26

Kwon S, Lee WJ, Fang LH, Kim B, Ahn HY. 2003 Mitogen-activated protein kinases partially regulate endothelin-1-induced contractions through a myosin light chain phosphorylation-independent pathway. *J Vet Med Sci* 65(2): 225-230

Kyriasis JM and Avruch J. 1996 Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18: 567-577

Kyriasis JM and Avruch J. 2001 Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. 2003 Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF- α is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kB transcription factors in articular chondrocytes. *Experimental Cell Research* 288: 208-217

Lopez-Hasaca M, Crespo P, Pellici PG. 1997 Linkage of G protein coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275: 394-397

MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM, Snyder SH. 1989 Endothelin: visualisation of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7285-9

Mankin H.J. et al.1994. *Orthopaedic Basic Science*: chap.1

Marcelino J, McDevitt CA, 1995 Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen, *Biochem Biophys Acta*, 1249: 180-188

Marletta MA 1993 Nitric oxide synthase structure and mechanism *J Biol Chem* 268: 12231-12234

Martel-Pelletier J, Pelletier JP. 1996 Wanted-the collagenases responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage. *Br J Rheumatol* 35: 818-820

Martel-Pelletier J, Alaaeddine N, Pelletier JP. 1999 Cytokines et their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 4: D694-703

Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, DiBatista JA, Pelletier JP. 1999 Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK). *Arthritis Rheum* 42: 2399-2409

- Martel-Pelletier J, Pelletier JP. 2000 Etiopathogenesis of osteoarthritis. In arthritis and allied conditions. A Textbook of Rheumatology, edn 14. Baltimore: Lippincot, Williams&Wilkins: 2195-2215
- Marumo F. 1992 Increased production of endothelin-1 in patients with inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*, 35(4): 397-400.
- Mazieres B. 1996 Gonarthroses 46(18): 2193-2200
- McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD. 1996 Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 184: 1519-1524
- McKnight GS, Clegg CH, Uhler MD, Chrivia JC, Cadd GG, Correll LA, Otter AD. 1988 Analysis of the camp-dependent protein kinase system using molecular genetic approaches. *Recent Progress in Hormone Research* 44: 307-335
- Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I. 1998 Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41: 2165-2174
- Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. 2000 Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 3. *Arthritis Rheum* 43(4): 801-811
- Mengshol JA, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. 2001 IL-1 induces collagenases-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for

Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res*, 29(21): 4361-4372

Messai H, Khatib A-M, Lebrun G, Aubin P, Moldovan F, Fiet J, Mitrovic DR. 1999 Endothelin-1 in monolayer cultures of articular chondrocytes from young and old rats: regulation by growth factors and cytokines. *Mechanism of Ageing and Development* 114 : 37-48

Messai H, Panasyuk A, Khatib A-M, Barbara A, Mitrovic DR. 2001 Endothelin-1 receptors on cultured rat articular chondrocytes: regulation by age, growth factors, and cytokines, and effect on cAMP production. *Mechanism of Ageing and Development* 122: 519-531

Michihisa Z, Meharra EJ, Kuhn K, Creighton-Achermann L, Lotz M. 2003 Accelerated aging-dependent development of osteoarthritis in alpha-1 deficient mice. *Arthritis Rheum* 48: 2873-2880

Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ. 1996 Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 97: 761-768

Mitrovici D, Quintero M, Stakovic A, Ryckewaert A. 1983 Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* 49: 309-316

Mitrovic D. et Mansat C. 2000. Le cartilage, un tissu conjonctif très différencié. Éd Privat : 25-40

Miyasaka N, Hirata Y, Ando K, Sato K, Morita H, Shichiri M, Kanno K, Tomita K,

Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. 1997 Collagenase-3 is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vivo mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 40: 1653-1661

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. 1991 Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142

Mort JS et Billington CJ. 2001 Articular cartilage and changes in arthritis. Matrix degradation. *Review Arthritis Res*, 3: 337-341

Mulsh A, Busse R, Liebau S, Forstermann U. 1998 LY83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 247(1): 283-288

Murrell GA, Jang D, Williams RJ. 1995 Nitric oxide activates metalloproteinase enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 5;206(1): 15-21

Nahir AM, Hoffman A, Lorber M, Keiser HR. 1991 Presence of immunoreactive endothelin in synovial fluid: analysis of 22 cases. *J Rheumatol*. 18(5): 678-680

Newton AC 2001 Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101: 2353-2364

Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP. 2000 The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 165: 3402-3410

Oddis CV, Simmons RL, Hattler BG, Finkel MS. 1996 Protein kinase A activation is required for IL-1-induced nitric oxide production by cardiac myocytes. *Am J Physiol* 271(1 Pt 1): C429-434

Ohira T, Ishikawa K. 1987 Hydroxyapatite deposition in osteoarthritic articular cartilage of the proximal femoral head. *Arthritis Rheum* 30(10): 1172

Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. 1999 IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* 162: 1096-1100

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993 Bcl-2 heterodimerises in vivo with a conserved homologue, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619

Pearson G 2001 Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological function. *Endocr. Rev.* 22:153-183

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

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

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, and Howell DS. 1997 Etiopathogenesis of osteoarthritis, in *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology* (Koopman WJ, ed), Williams&Wilkins, Baltimore, pp. 1969-1984.

- Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, DiBattista JA, Martel-Pelletier J. 1998 Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 41(7): 1275-1286
- Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Majalathi-Palviainen T, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. 2003 Endothelin-1-specific activation of B-type natriuretic peptide gene via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear ETS factors. *J Biol Chem* 278(6): 3969-3975
- Plows D, Probert L, Georgopoulos S, Alexopoulou L, Kollias G. 1995 The role of tumor necrosis factor (TNF) in arthritis: studies in transgenic mice. *Rheumatol Eur Suppl* 2: 51-54
- Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC. 2003 Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem*
- Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T. 1996 MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16(3): 1247-1255
- Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. 1996 The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. *J Clin Invest*, 97: 2011-2019.
- Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B, Lotz M. 1994 The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage* 2: 199-206

- Repo RU, Finlay JB. 1977 Survival of articular cartilage after controlled impact. *J Bone Joint Surg Am* 59:1068-1076
- Resnik TJ, Scott-Burden T, Buhler FR. 1989 Activation of phospholipase A₂ by endothelin in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 279-286
- Reunanen N, Li SP, Ahonen M, Foschi M, Han J, Kahari VM. 2002 Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilisation. *J Biol Chem* 277(35): 32360-32368
- Rhee SG and Choi KD. 1992 Regulation of inositol phospholipid-specific PLC isoenzymes. *Journal of Biological Chemistry* 267: 12393-12396
- Robin P, Boulven I, Desmyter C, Harbon S, Leiber D. 2002 ET-1 stimulates ERK signaling pathways through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C251-C260
- Robinson CJ, Scott PH, Allan AB, Jess T, Gould GW, Plevin R. 1996 Treatment of vascular smooth muscle cells with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides directed against p42 and p44 mitogen-activated protein kinases abolishes DNA synthesis in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J* 320(Pt. 1): 123-127
- Rosano L, Varmi M, Salano D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. 2001 Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 61: 8340-8346
- Roy-Beaudry M, Martel-Pellrtier J, Pelletier JP, N'Barek KN, Christgau S, Shipkolye F, Moldovan F 2003 Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via

- matrix métalloprotéase 1 and matrix métalloprotéase 13 induction Arthritis Rheum 48(10): 2855-2864
- Ryckewaert A. 1987 Rheumatologie. Pathologie osseuse et articulaire. Médecine-Sciences Flammarion édit., p. 374-375
- Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. 1999 Interleukin-1 β -converting enzyme/Caspase-1 in human osteoarthritic tissues: Localisation and role in the maturation of IL-1 β and IL-18. Arthritis Rheum 42: 1577-1587
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto k et al. 1990 Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. Nature 343: 732-735
- Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K. 1995 Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. J Clin Invest 96: 2357-2363
- Salh B, Wagey R, Marotta A, Tao JS, Pelech S. 1998 Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in liposaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxyde production. Journal of Immunology 161(12): 6947-6954
- Sanchez-Margalet V, Goldfine ID, Vlahos CJ, Sung CK. 1994 Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294004. Biochemical and Biophysical Research Communications 204: 446-452
- Sandy JD, Neame PJ, Boynton PL, Flannery CR. 1991 Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. J Biol Chem 266: 8683-8685

- Schmid T, Popp R et Linsenmeyer T, 1990, Hypertrophic cartilage matrix: type X collagen, supramolecular assembly, and calcification. *Ann NY Acad Sci* 580, 64-73
- Schramek H, Wang J, Konieczkowski M, Rose PM, Sedor JR, Dunn MJ 1994a Endothelin-1 stimulates cytosolic phospholipase A2 in Chinese hamster ovary cells stably expressing the human ET_A or ET_B receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 992-997
- Schwartz A, Godes M, Thone-Reineke C, Theuring F, Bauer C, Neumayer H-H, Hocher B. 2002 Tissue-dependent expression of matrix proteins in human endothelin-1 transgenic mice. *Clinical Science* 103: 39S-43S
- Scott JD 1991 Cyclic nucleotide-dependent protein-kinases. *Pharmacology and Therapeutics* 50: 123-145
- Shakibaei M, John T, De Souza P, Rahmanzadeh R, Merker HJ. 1999 Signal transduction by β 1-integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochemical Journal* 342: 615-623
- Shindo T, Kurihama H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Fukada M, Akimoto Y, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K. 2002 Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *Journal of Molecular Medicine* 80(2): 105-116
- Shlopov BV, Lie WR, Mainardy CL, Cole AA, Chubinaskaya S, Hasty KA. 1997 Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 40: 2065-2074

- Shraga-Levine Z, Galron R, Sokolovsky M. 1994 Cyclic GMP formation in rat cerebellar slices is stimulated by endothelins via nitric oxide formation and by sarafotoxins via formation of carbon monoxide. *Biochemistry* 33: 14656-14659
- Shukla SD, Halkenda SP. 1991 Phospholipase D in cell signaling and its relationship to phospholipase C. *Life Sci*, 48: 851-866
- Sokolovsky M, Shraga-Levine Z, Galron R. 1994 Ligand-specific stimulation/inhibition of cAMP formation by a novel endothelin receptor subtype. *Biochemistry* 33: 11417-11419
- Stanton LA, Underhill TM, Beier F. 2003 MAP kinases differentiation in chondrocytes differentiation. *Developmental Biology* 263(2): 165-175
- Stockwell RA. 1979 *Biology of cartilage cells*. Cambridge: Cambridge University Press p.329
- Stojilkovic SS, Vukicevic S, Luyten FP. 1994 Calcium signaling in endothelin- and platelet-derived growth factor-stimulated chondrocytes. *J Bone Miner Res* 9: 705-714
- Studer RK, Georgescu HI, Miller LA, Evans CH. 1999 Inhibition of transforming growth factor beta production by nitric oxide-treated chondrocytes: implications for matrix synthesis. *Arthritis Rheum* 42: 248-257
- Sugden PH. 2003 An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 34: 871-886
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. 2001 Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208

- Tanno M, Bassi R, Gorog DA, Saurin AT, Jiang J, Heads RJ, Martin JL, Davis RJ, Flavell RA, Marber MS. 2003 Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circulation* 107:254-261
- Tasken K, Skalhegg BS, Solberg R, Anderson KB, Taylor SS, Lea T, Blomhoff HK, Jahnsen T, Hansson V. 1993 Novel isoenzymes of camp-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *Journal of Biological Chemistry* 268: 21276-21283
- Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I. 2000 Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 275: 18566-18573
- Ui M, Okada T, Hazeki K, Hazeki O. 1995 Wortmannin as a unique probe for an intracellular signaling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 303-307
- Van de Loo FA, Joosten LA, Van Lent PL, Arntz OJ, Van den Berg WB. 1995 Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 164-172
- Vanhaesebroek B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD. 1997 Phosphoinositide 3-kinase: a conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 267-272
- Vankemmelbeke NM, Jones GC, Fowles GC, Ilic MZ, Handley CJ, Day AJ, Knight CG, Mort JS, Buttle DJ. 2003 Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters. *Eur J Biochem* 270(11): 2394-2403

- Vignon E, Conrozier T, Hellio MP, Piperno M, Mathieu P, Richard M. 1997 Biological markers of the destruction of articular cartilage : current aspects 47(17 Suppl): S11-15
- Wang Y, Toury R, Hauchecorne M, Balmain N. 1997 Expression of Bcl-2 protein in the epiphyseal plate cartilage and trabecular bone of growing rats. *Histochemistry and Cell Biology* 108: 45-55
- Webb M, Meek T. 1997 Inhibitors of endothelin. *Medicinal Research Reviews*. 17(1) : 17-67
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. 1999 Mitogen-activated protein kinase: conservation of three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79(1): 143-180
- Windischhofer W, Zach D, Fauler G, Raspotnig G, Kofeler H, Leis HJ. 2002 Involvement of Rho and p38 MAPK in endothelin-1-induced expression of PGHS-2 mRNA in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 17(10): 1774-1784
- Woessner JF 1991 Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5: 2145-2154
- Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D et al. 1994 ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* ; 78:473-85.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y et al. 1988 A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-5

Yang C, Li SW, Helminen HJ, Khillan JS, Bao Y, Prockop DJ. 1997 Apoptosis of chondrocytes in transgenic mice lacking collagen II. *Experimental Cell Research* 235: 370-373

Yano H, Agatsuma T, Nakanishi S, Saitoh Y. 1995 Biochemical and pharmacological studies with KT7692 and LY294002 on the role of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc epsilon mediated signal transduction. *Biochemical Journal* 312: 145-150

Yoshida H, Imafuku Y, Ohhara M, Miyata M, Kasukawa R, Ohsumi K, Horiuchi J. 1998 Endothelin-1 production by human synoviocytes. *Ann Clin Biochem*, 35: 290-294

CHAPITRE VIII : ANNEXE

Florina Moldovan

De: Arthritis Research & Therapy Editorial [editorial@arthritis-research.com]
Envoyé: 29 novembre 2004 07:46
À: Dr Florina Moldovan
Objet: MS: 9671972135362789 manuscript ready to accept - please check

Authors: Christina Alexandra Manacu, Johanne Martel-Pelletier, Marjolaine Roy-Beaudry, Jean Pierre Pelletier, Julio C Fernandes, Fazool S Shipkolye, Dragoslav R Mitrovic and Florina Moldovan
Title : Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and up-regulates collagenase production
Journal: Arthritis Research & Therapy
MS : 9671972135362789

Dear Dr Moldovan

Arthritis Research & Therapy is ready to accept your manuscript. Please do the following:

- Pay the processing charge for your article. Because you have provided a Reference Manager 10 formatted reference list, the payment is reduced by \$50 to \$475.

You can do this by going to:

http://arthritis-research.com/manuscript/login/man.asp?txt_nav=msd&txt_man_id=9671972135362789

Your article will then be formally accepted for publication.

Please note we will not proceed until payment details have been received. Proofs will be sent to you for checking in the next two to three weeks. Please inform the Editorial Office if you will be away at this time.

As soon as your article is ready for publication it will be published in full online with complete citation details. The abstract of your article will also be included in a forthcoming print issue, which you will be sent in due course.

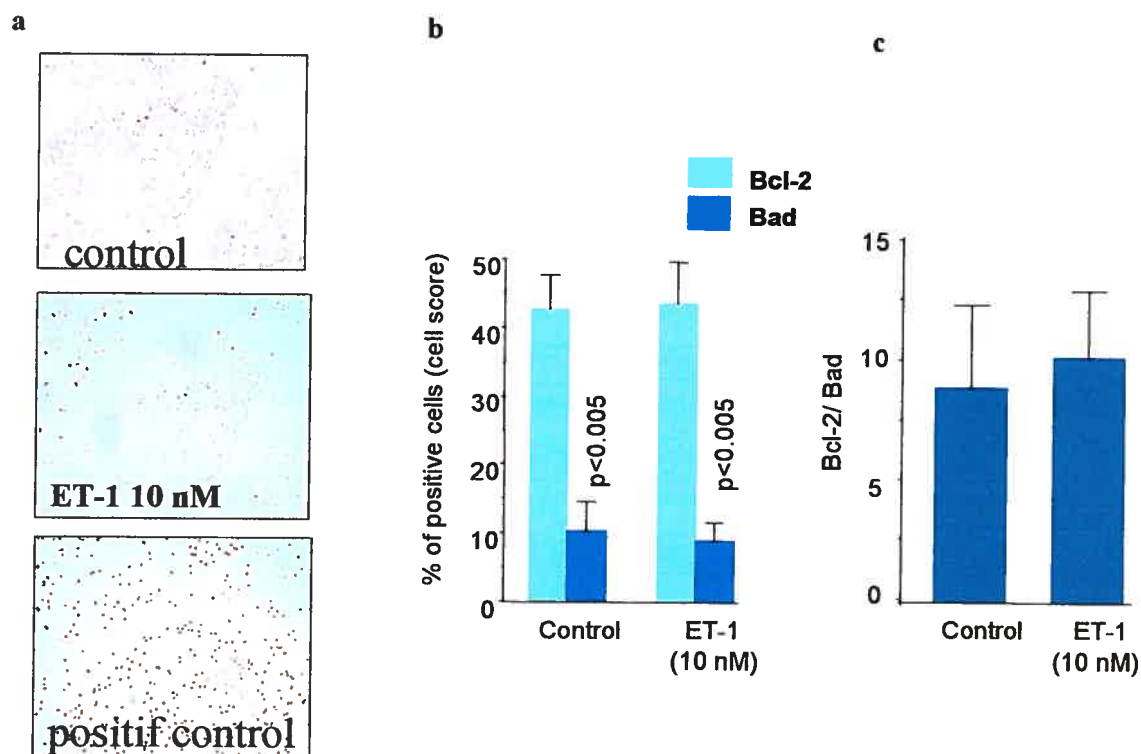
With best wishes,

The Arthritis Research & Therapy Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 7323 0323
e-mail: editorial@arthritis-research.com
Web: <http://arthritis-research.com>

Figure 1 – L'effet de l'ET-1 sur l'apoptose chondrocytaire

Figure 1 représente l'effet de l'endotheline-1 sur l'apoptose. Ces résultats ont été mentionnés, mais non présentés dans l'article suite à la suggestion des réviseurs. Les chondrocytes OA confluents ont été incubés pour 72 heures à 37° C dans du DMEM contenant 2.5% de sérum de veau fœtal avec ou sans ET-1 (10nM) puis analysés par les techniques de TUNEL et d'immunocytochimie pour mettre en évidence la présence des protéines Bad et Bcl-2. **a.** Détection de l'apoptose par la technique TUNEL : contrôle (sans ET-1), stimulé par l'ET-1 et le contrôle positif obtenu par traitement des chondrocytes 15 minutes avec la DNase I. **b.** Expression des protéines Bcl-2 et Bad dans les chondrocytes OA humaines incubées avec ou sans ET-1 (10 nM). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm l'écart-type pour les chondrocytes positifs pour Bcl-2 et Bad et la valeur de p ($p < 0.005$) indique que les résultats sont significatifs. **c.** L'histogramme montre le ratio Bcl2/Bad en absence ou en présence de l'ET-1 (10 nM). Cette figure est représentative de 6 expériences indépendantes.



COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

45^e Réunion annuelle du club de Recherches Cliniques du Québec, 25-27 septembre 2003 ;

6^{ième} Congrès annuel des étudiants, stagiaires, et résidents du Centre de recherche du CHUM, 18 décembre 2003 ;

XIX^e Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et postgradués, Centre de recherche de l'Hôpital St.Justine, juin 2004

ENDOTHÉLINE-1 INDUIT LA PRODUCTION DE L'OXYDE NITRIQUE (NO), LA MMP-1 ET LA MMP-13 DANS LES CHONDROCYTES ARTHROSIQUES

C. A. Manacu, M. Roy-Beaudry, J.-P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, J. Fernandes, F. Shipkolye et F. Moldovan
CR de l'Hôpital St.Justine, Unité de recherche en arthrose Hôpital Notre-Dame, Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal

Introduction : L'arthrose (OA) est le résultat de l'incapacité des chondrocytes à maintenir l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Récemment, il y a été montré que l'ET-1 agit sur la régulation de la MMP-1 et la MMP-13, et nous avons caractériser le mécanisme d'action de l'ET-1 dans l'induction de la production de ces deux métalloprotéases. **Matériel et méthodes :** Les métalloprotéases, MMP-1 et MMP-13, et le NO ont été mesurés par Elisa et la réaction de Griess respectivement. L'iNOS, la p38 MAP kinase, l'Akt, la BAD, la bcl-2 et l'apoptose ont été déterminés par Western Blot et TUNEL. **Résultats :** Nous avons démontré que l'ET-1 induit la production de la MMP-1 et MMP-13 via l'activation de la p38 MAP kinase, PKA et la cGMP cyclique NO-dépendante. La production de la MMP-1 et de la MMP-13 est parallèle au relâchement du NO qui s'effectue de manière dose dépendante et via l'induction de l'iNOS. L'inhibition de la voie cGMP suivie de la stimulation des chondrocytes par l'ET-1 inhibe à la fois la production du NO et de la MMP-1 et MMP-13. Puisque à des concentrations élevées le NO peut initier l'apoptose, nous avons aussi exploré l'effet de l'ET-1 sur la fragmentation de l'ADN, la bcl-2, la BAD et l'induction de l'Akt. Nos résultats montrent que l'ET-1 n'induit pas l'apoptose, mais aurait plutôt un effet protecteur, en agissant sur la phosphorylation de l'Akt. **Conclusion :** Dans les chondrocytes OA, l'ET-1 contrôle la production de la MMP-1 et de la MMP-13 et le relâchement du NO suite à l'induction de l'iNOS.

4th World Congress of the Global Arthritis Research Network, 19-22 septembre 2004;

Journée scientifique à l'occasion du centenaire de la Faculté de Médecine Dentaire de l'Université de Montréal, 17 septembre 2004

ENDOTHELIN-1 IN OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES TRIGGERS NITRIC OXIDE PRODUCTION AND UP-REGULATES COLLAGENASE PRODUCTION

CA Manacu¹, J Martel-Pelletier², M Roy-Beaudry², J-P Pelletier², JC. Fernandes³, F Shipkolye¹, F Moldovan^{1,4} *Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine¹, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Unité de recherche en Arthrose, Hôpital Notre-Dame², Hôpital Sacre Cœur³, Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal⁴, Montréal (Qc), Canada*

Background: Cartilage degradation in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) constitutes a major structural change in the joint, which may severely impair its function causing pain and disability. This degradation is accompanied by the release in the synovial fluid of degraded matrix constituents that primarily result from an increased matrix catabolism. Various factors are directly involved in this process. Endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor and pro-mitogen peptide for many cell types, including chondrocytes, was recently identified as one such factor.

Objective: We previously demonstrated that endothelin-1 (ET-1) induces MMP-1 and MMP-13 synthesis, secretion and activation. Here, we investigated the mechanism by which ET-1 induces the production of these two MMPs.

Methods: Human OA chondrocytes were cultured in the presence of ET-1 with or without inhibitors of protein kinase or LY83583 (an inhibitor of soluble guanylate cyclase and of cGMP) and then MMP-1, MMP-13 and NO levels were measured by ELISA and Griess reaction, respectively. Additionally, iNOS and activated forms of p38 MAP kinase, p44/42, SAP/JNK and serine threonine kinase Akt were determined by Western blot, Bad and Bcl2 proteins by immunocytochemistry and apoptosis by TUNEL.

Results: ET-1 greatly increased MMP-1 and MMP-13 production, NO release and iNOS expression. LY83583 decreased the production of both MMPs below basal levels, whereas the inhibitor of p38 kinase, SB202190, suppressed ET-1-stimulated production only. Similarly, the ET-1-induced NO production was partially suppressed by the p38 kinase inhibitor and completely suppressed by the PKA kinase inhibitor, KT5720, and LY83583, suggesting the involvement of these enzymes in ET-1 signaling pathways. ET-1 does not induce apoptosis and could even have a protective effect through the induction of Akt phosphorylation.

Conclusions: In human OA chondrocytes, ET-1 controls the production of MMP-1 and MMP-13. ET-1 also induces NO release via iNOS induction. Thus, ET-1 and NO should become important target molecules for future therapies aimed at stopping cartilage destruction.

46^e Réunion annuelle du club de Recherches Cliniques du Québec, 23-25 septembre 2004

L'ENDOTHÉLINE JOUE UN ROLE CATABOLIQUE DANS LA DÉGRADATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE VIA L'INDUCTION DE L'AGRÉCANASE-1

C Manacu¹; J Frappier²; F Shipkolye¹; J Martel-Pelletier²; J-P Pelletier²; S Christgau³ et F Moldovan^{1,4}. ¹CR Hôpital St-Justine; ²Unité de recherche en arthrose; CHUM; Hôpital Notre-Dame; ³Nordic Bioscience, Denmark; ⁴Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal.

Lors de l'arthrose, il y a un déséquilibre entre la dégradation de la matrice et sa synthèse via les métalloprotéases (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP). L'endothéline-1 (ET-1), a notamment un rôle au niveau de la dégradation du cartilage. Nos travaux récents ont montré que l'ET-1 induit la production de la MMP-1 et -13 ainsi que la formation de néoépitopes du collagène de type II.

Objectifs : Dans ce travail nous avons exploré l'effet de l'ET-1 sur la dégradation des agrécanes.

Méthodes : Les tissus explorés proviennent du cartilage de patients normaux ou atteints d'arthrose. La présence des fragments d'agrécane a été analysée dans le milieu de culture des explants de cartilage incubés avec ou sans ET-1. Des tissus ont également été digérés et les cellules gardées en culture, stimulées et analysées par RT-PCR et Western Blot. L'expression de l'agrécane-1 en réponse à une stimulation par l'ET-1 a été déterminée par RT-PCR.

Résultats et conclusions : Les tissus incubés avec de l'ET-1 contiennent davantage de fragments d'agrécane que ceux incubés sans ET-1. Par RT-PCR, il a été possible de démontrer que la présence d'ET-1 induit l'expression de l'ARN messager d'agrécane-1 produite par les chondrocytes. Le mécanisme d'action par lequel l'ET-1 agit implique le récepteur ETA, et les voies de signalisation activées sont la voie des MAP kinase (p38 MAP kinase, p44/42, SAP/JNK), de la PKB (Akt) et de la p70 S6 kinase. L'action de l'ET-1 dans les chondrocytes semble se produire via l'induction de l'IL-1 β et l'induction de l'iNOS. L'ET-1 a plusieurs fonctions dans la dégradation du cartilage. Elle augmente la quantité de fragments d'agrécane et de collagène de type II. De plus, elle augmente la production de la MMP-1 et -13. Ces actions confirment son rôle catabolique dans la matrice extracellulaire.

COMMUNICATIONS ORALES

35^{ième} Conférence laurentienne de rhumatologie. Mont Tremblant, Québec, mai 2004.

ENDOTHÉLINE-1 INDUIT LA PRODUCTION DE L'OXYDE NITRIQUE (NO), LA MMP-1 ET LA MMP-13 DANS LES CHONDROCYTES ARTHROSIQUES

C A. Manacu, M Roy-Beaudry, J-P Pelletier, J Martel-Pelletier, J Fernandes, F Shipkolye et F Moldovan
CR de l' Hôpital St.Justine, Unité de recherche en arthrose Hôpital Notre-Dame, Faculte de médecine dentaire, Université de Montréal

Introduction : L'arthrose (OA) est le résultat de l'incapacité des chondrocytes à maintenir l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Récemment, il y a été montré que l'ET-1 agit sur la régulation de la MMP-1 et la MMP-13, et nous avons caractériser le mécanisme d'action de l'ET-1 dans l'induction de la production de ces deux métalloprotéases. **Matériel et méthodes :** Les métalloprotéases, MMP-1 et MMP-13, et le NO ont été mesurés par Elisa et la réaction de Griess respectivement. L'iNOS, la p38 MAP kinase, l'Akt, la BAD, la bcl-2 et l'apoptose ont été déterminés par Western Blot et TUNEL. **Résultats :** Nous avons démontré que l'ET-1 induit la production de la MMP-1 et MMP-13 via l'activation de la p38 MAP kinase, PKA et la cGMP cyclique NO-dépendante. La production de la MMP-1 et de la MMP-13 est parallèle au relâchement du NO qui s'effectue de manière dose dépendante et via l'induction de l'iNOS. L'inhibition de la voie cGMP suivie de la stimulation des chondrocytes par l'ET-1 inhibe à la fois la production du NO et de la MMP-1 et MMP-13. Puisque à des concentrations élevées le NO peut initier l'apoptose, nous avons aussi exploré l'effet de l'ET-1 sur la fragmentation de l'ADN, la bcl-2, la BAD et l'induction de l'Akt. Nos résultats montrent que l'ET-1 n'induit pas l'apoptose, mais aurait plutôt un effet protecteur, en agissant sur la phosphorylation de l'Akt. **Conclusion :** Dans les chondrocytes OA, l'ET-1 contrôle la production de la MMP-1 et de la MMP-13 et le relâchement du NO suite à l'induction de l'iNOS.

The 10th Annual Canadian Connective Tissue Conference. Toronto, Ontario, mai 2004

ENDOTHELIN-1 IN OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES TRIGGERS NITRIC OXIDE PRODUCTION AND UP-REGULATES COLLAGENASE PRODUCTION

CA Manacu¹, J Martel-Pelletier², M Roy-Beaudry², J-P Pelletier², JC. Fernandes³, F Shipkolye¹, F Moldovan^{1,4} Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine¹, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Unité de recherche en Arthrose, Hôpital Notre-Dame², Hôpital Sacre Cœur³, Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal⁴, Montréal (Qc), Canada

We previously demonstrated that endothelin-1 (ET-1) induces MMP-1 and MMP-13 synthesis, secretion and activation. Here, we investigated the mechanism by which ET-1 induces the production of these two MMPs. Human OA chondrocytes were cultured in the presence of ET-1 with or without inhibitors of protein kinase or LY83583 (an inhibitor of soluble guanylate cyclase and of cGMP) and then MMP-1, MMP-13 and NO levels were measured by ELISA and Griess reaction, respectively. Additionally, iNOS and activated forms of p38 MAP kinase, p44/42, SAP/JNK and serine threonine kinase Akt were determined by Western blot, Bad and Bcl2 proteins by immunocytochemistry and apoptosis by TUNEL. ET-1 greatly increased MMP-1 and MMP-13 production, NO release and iNOS expression. LY83583 decreased the production of both MMPs below basal levels, whereas the inhibitor of p38 kinase, SB202190, suppressed ET-1-stimulated production only. Similarly, the ET-1-induced NO production was partially suppressed by the p38 kinase inhibitor and completely suppressed by the PKA kinase inhibitor, KT5720, and LY83583, suggesting the involvement of these enzymes in ET-1 signaling pathways. ET-1 does not induce apoptosis and could even have a protective effect through the induction of Akt phosphorylation. In human OA chondrocytes, ET-1 controls the production of MMP-1 and MMP-13. ET-1 also induces NO release via iNOS induction. Thus, ET-1 and NO should become important target molecules for future therapies aimed at stopping cartilage destruction.