

2m11.3292.4

Université de Montréal

**ÉTUDE DES EFFETS D'INJECTIONS INTRA-ARTICULAIRES RÉPÉTÉES
D'ACÉTONIDE DE TRIAMCINOLONE SUR LE MÉTABOLISME DU
CARTILAGE CHEZ LE CHEVAL**

par

Christophe CELESTE, DMV

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

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

Avril 2005

© Christophe Céleste, 2005



SF
607
U54
2005
v.020

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 :

ÉTUDE DES EFFETS D'INJECTIONS INTRA-ARTICULAIRES RÉPÉTÉES
D'ACÉTONIDE DE TRIAMCINOLONE SUR LE MÉTABOLISME DU CARTILAGE
CHEZ LE CHEVAL

présenté par :

Christophe CELESTE, DMV

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

André Bisailon, président-rapporteur

Sheila Laverty, directrice de recherche

A.Robin Poole, codirecteur

Christine Théoret, membre du jury

Mémoire accepté le :



Résumé

Même si les glucocorticoïdes (GC) sont fréquemment utilisés par voie intra-articulaire (IA) pour traiter les maladies articulaires, les effets de leur utilisation répétée sur le cartilage demeurent controversés. Le but de notre étude était de déterminer quels étaient les effets d'une dose IA cliniquement recommandée d'acétonide de triamcinolone (TA) sur les biomarqueurs du métabolisme du cartilage présents dans le liquide synovial (SF). Dix chevaux adultes, exempts d'ostéoarthrose (OA) radiocarpienne, furent choisis. Une articulation radiocarpienne par cheval fut aléatoirement choisie pour recevoir la TA, l'autre articulation radiocarpienne servant d'articulation contrôle. Des arthrocentèses furent réalisées hebdomadairement dans chaque articulation pendant treize semaines. Les concentrations synoviales basales de chaque biomarqueur dans chaque articulation furent établis durant les trois premières semaines de l'étude. Chaque articulation était son propre contrôle. Aux semaines trois, cinq et sept, douze mg d'une suspension stérile de TA furent injectés dans les articulations traitées et un volume équivalent de solution saline stérile (0.9%) fut injecté dans les articulations contrôles. Les concentrations synoviales des biomarqueurs du métabolisme des protéoglycanes aggrécane (PGA) (CS 846 et KS), du clivage du collagène de type I et de type II (C1,2C), et de la synthèse de collagène de type II (COLII) (CPII) furent déterminées par réaction immunologique. Dans les articulations traitées, une augmentation significative des concentrations synoviales des épitopes CS 846, KS, C1,2C et CPII fut observée à la suite de l'injection IA de TA. Une augmentation significative des concentrations synoviales des épitopes C1,2C et CP II fut aussi observée dans les articulations contrôles suite à l'injection IA de TA dans les articulations traitées. Des différences significatives furent observées entre les articulations traitées et les articulations contrôles pour tous les biomarqueurs sauf CP II. Ces résultats indiquent que la TA altère les métabolismes du cartilage articulaire et du collagène dans les articulations traitées et dans les articulations contrôles, suggérant un éventuel effet systémique de cette drogue. Ces résultats appuient donc l'hypothèse qu'à long terme, les injections IA de TA modifient le métabolisme articulaire et peuvent avoir des effets délétères.

Mots clés: cartilage, biomarqueurs, glucocorticoïdes, triamcinolone, cheval, protéoglycane aggrécane, collagène.

Abstract

Although intraarticular (IA) corticosteroids are frequently used to treat joint disease, the effects of their repeated use on articular cartilage remains controversial. The aim of our study was to determine the effects of a clinically recommended dose of IA triamcinolone acetonide (TA), on synovial fluid (SF) biomarkers of cartilage metabolism. Ten adult horses, free of osteoarthritis (OA) in their radiocarpal joints, were studied. One radiocarpal joint of each horse was randomly chosen for treatment and the contralateral anatomically paired joint acted as the control. Aseptic arthrocentesis was performed weekly on both joints for 13 weeks. The initial results from the first 3 weeks of the experimental period established baseline untreated control marker levels for each joint, each being its own control. On weeks 3, 5, and 7, a sterile suspension of 12 mg of TA was injected into the treated joint and an equivalent volume of sterile saline solution (0.9%) was injected into the control joint. SF was immunoassayed for biomarkers of aggrecan turnover (CS 846 & KS), types I and II collagen cleavage (C1,2C) and type II collagen synthesis (CPII). In treated joints, there was a significant increase in CS 846, KS, C1,2C and CPII epitope concentrations following IA TA injections when compared to baseline levels. There was also a significant increase in C1,2C and CP II epitope concentrations in the contralateral control joints following IA TA injections in the treated joint. Significant differences were observed between treated and control joints for all markers except CPII. These findings indicate that TA alters articular cartilage and collagen metabolism in treated and, interestingly, also in control joints, suggesting a systemic effect of the drug. Though intuitively the observed findings would favour the hypothesis that long term IA TA treatment changes joint metabolism and this may have detrimental effects.

Key words: cartilage, biomarkers, corticosteroids, triamcinolone, horse, proteoglycan aggrecan, collagen.

Table des Matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Chapitre I : Recension de la littérature.....	3
I.1. <u>L'articulation synoviale</u>	3
I.1.1. La membrane synoviale.....	3
I.1.2. Le liquide synovial.....	3
I.1.3. Le cartilage articulaire.....	4
I.1.3.1. Les chondrocytes.....	5
I.1.3.2. La matrice extracellulaire.....	5
I.1.3.2.1. Eau.....	5
I.1.3.2.2. Protéoglycanes.....	6
I.1.3.2.3. Collagènes.....	7
I.1.3.2.4. Autres molécules.....	8
I.1.4. Capsule et ligaments.....	8
I.2. <u>L'ostéoarthrose : une maladie arthritique majeure</u>	9
I.2.1. Pathogénie de l'ostéoarthrose.....	9
I.2.1.1. Métallo-protéases et autres enzymes protéolytiques.....	10
I.2.1.2. Cytokines.....	11
I.2.1.3. Inhibiteurs des métallo-protéases.....	12
I.2.1.4. Composants matriciels.....	12
I.2.2. Évaluation clinique du cartilage articulaire.....	13
I.2.2.1. Évaluation macroscopique directe <i>in vivo</i>	14

I.2.2.1.1. Radiographie.....	14
I.2.2.1.2. Échographie.....	14
I.2.2.1.3. Imagerie par résonance magnétique.....	15
I.2.2.1.4. Arthroscopie.....	15
I.2.3.2. Évaluation macroscopique et microscopique indirecte <i>in vivo</i> : analyse du liquide synovial.....	15
1.2.3.2.1. Paramètres de l'inflammation.....	16
1.2.3.2.2. Biomarqueurs du métabolisme cartilagineux articulaire.....	16
1.2.3.2.2.1. Biomarqueurs du métabolisme des protéoglycanes	18
I.2.3.2.2.1.1. Biomarqueurs de dégradation.....	18
I.2.3.2.2.1.2. Biomarqueurs de synthèse.....	19
I.2.3.2.2.2. Protéine oligomérique du cartilage COMP.....	20
I.2.3.2.2.3. Biomarqueurs du métabolisme du collagène de type II.....	20
I.2.3.2.2.3.1. Biomarqueurs de dégradation.....	20
I.2.3.2.2.3.2. Biomarqueurs de synthèse.....	21
I.2.4. Avenues de traitement.....	24
I.2.4.1. Moyens thérapeutiques actuels : les anti-douleurs	24
I.2.4.1.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS	25
I.2.4.1.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.....	25
I.2.4.1.3. Autres molécules.....	26
I.2.4.2. Futures avenues de traitement.....	26
I.2.4.2.1. Modulations des cytokines pro-inflammatoires.....	26
I.2.4.2.2. Régulation de la dégradation des composants matriciels.....	26
I.2.4.2.3. Stimulation de la synthèse des composants matriciels.....	27
I.3. <u>Glucocorticoïdes, articulations et cartilage articulaire</u>	29
I.3.1. Pharmacologie des glucocorticoïdes.....	29
I.3.1.1. Structure.....	29
I.3.1.2. Biodisponibilité.....	30
I.3.1.3. Mode d'action.....	30

1.3.2. Effets des glucocorticoïdes sur les articulations.....	32
I.3.2.1. Effets anti-inflammatoires.....	32
I.3.2.2. Effets sur les principales structures articulaires.....	32
I.3.2.2.1. Effets sur la membrane synoviale.....	32
I.3.2.2.2. Effets sur le cartilage articulaire.....	34
I.3.2.2.2.1. Effets macroscopiques et histologiques.....	35
I.3.2.2.2.2. Effets sur les composants matriciels	35
1.3.3. Effets systémiques des glucocorticoïdes injectés intra-articulaire.....	35
Chapitre II : Article	39
II.1. <u>Summary</u>	41
II.2. <u>Introduction</u>	42
II.3. <u>Methods</u>	45
II.3.1. Animals.....	45
II.3.2. Clinical examination.....	46
II.3.3. Synovial fluid examination.....	46
II.3.4. Synovial fluid volume.....	46
II.3.5. Biomarker assays.....	46
II.3.5.1. Aggrecan 846 epitope	46
II.3.5.2. KS epitope.....	47
II.3.5.3. CP II epitope	47
II.3.5.4. C1,2C epitope	47
II.3.6. Statistical analysis	49
II.4. <u>Results</u>	50
II.4.1. Clinical examination	50
II.4.2. Synovial fluid analyses.....	50
II.4.3. Synovial fluid volume.....	50
II.4.4. Aggrecan 846 epitope	50
II.4.5. KS epitope	51
II.4.6. CP II epitope	51

II.4.7. C1,2C epitope 52

II.4.8. Correlation between aggrecan and type II collagen epitopes 52

II.5. Discussion..... 54

II.6. Acknowledgements.....59

II.7. References.....60

II.8. Figure captions.....66

II.9. Figure legend..... 67

Chapitre III : Discussion 70

Conclusion76

Bibliographie.....77

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I – Biomarqueurs du métabolisme du cartilage articulaire	23
Tableau II – Principales études ayant porté sur les synovites ou les changements observés au niveau de la membrane synoviale lors de traitement IA par des GC	33
Tableau III – Principales études ayant montré les changements macroscopiques cartilagineux survenant lors de traitement IA à base de GC chez le cheval	36
Tableau IV – Principales études ayant montré les changements survenant au niveau des teneurs en composants matriciels lors de traitement IA à base de GC chez le cheval	37

Liste des figures

Chapitre I

- Figure 1** – Représentation schématique de la membrane synoviale du liquide synovial et du cartilage articulaire montrant les différents échanges existant entre ces structures – selon Garnero 2000 4
- Figure 2** – Structure d'un protéoglycane aggrécané nouvellement synthétisé chez l'Homme – selon Poole 2001 6
- Figure 3** – Représentation schématique d'une fibre de collagène de type II – selon Poole 2001 8
- Figure 4** – Localisation des biomarqueurs du métabolisme des protéoglycanes aggrécanés – selon Poole 2001 18
- Figure 5** – Épitope C1,2C libéré par l'action des collagénases sur l'extrémité carboxy-terminale du collagène de type II – selon Poole 2001 21
- Figure 6** – Structure du procollagène de type II montrant les sites de clivage par les métalloprotéases – selon Mayne 2001 22
- Figure 7** – Épitope CP II libéré par l'action de la carboxypeptidase sur l'extrémité carboxy-terminale du procollagène de type II – selon Poole 2001 22
- Figure 8** – Molécule de triamcinolone 29
- Figure 9** – Molécule de méthylprednisolone 29

Figure 10 – Mode d'action simplifié des glucocorticoïdes au niveau cellulaire – selon Trotter 1996	31
---	----

Chapitre II

Figure 1 – Diagram illustrating chronological events over a thirteen week period.	68
--	----

Figure 2 –	69
(A) Synovial fluid volumes of control and treated joints.	
(B) CS 846 epitope concentration per joint in the SF of control and treated joints.	
(C) KS epitope concentration per joint in the SF of control and treated joints.	
(D) C1,2C epitope concentration per joint in the SF of control and treated joints.	
(E) CP II epitope concentration per joint in the SF of control and treated joints.	

Liste des sigles et des abréviations

AINS	anti-inflammatoire non-stéroïdien
AIS	anti-inflammatoire stéroïdien
BET	béthaméthasone
BMP	bone morphogenetic protein, protéine osseuse morphogénique
COLII	collagène de type II
COMP	<i>cartilage oligomeric protein</i> , protéine oligomérique du cartilage
COX-1	cyclo-oxygénase 1
COX-2	cyclo-oxygénase 2
CPII	propeptide carboxy-terminal du tropocollagène de type II
CS	<i>chondroitin sulfate</i> , sulfate de chondroïtine
DEX	dexaméthasone
DMOADs	<i>disease modifying osteoarthritis drugs</i> , médicament modifiant l'évolution de l'ostéoarthrose
GAG	glycosaminoglycanes
GC	glucocorticoïdes
HA	<i>hyaluronic acid</i> , acide hyaluronique
HCA	<i>hydrocortisone acetate</i> , acétate d'hydrocortisone
IA	intra-articulaire
IGF-I	<i>insulin-like growth factor I</i> , facteur de croissance ressemblant à l'insuline I
IL-1	interleukine-1
IS	iodo-acétate de sodium
KS	<i>keratan sulfate</i> , sulfate de kératane
LPS	lipo-poly-saccharide
MMP	<i>matrix metalloproteases</i> , métallo-protéases matricielles
MPA	<i>methylprednisolone acetate</i> , acétate de méthylprednisolone

MPS	<i>methylprednisolone succinate</i> , succinate de méthylprednisolone
OA	<i>osteoarthritis</i> , ostéoarthrose
PBZ	phénylbutazone
PG	protéoglycanes
PGA	protéoglycanes aggrécans
PGE2	prostaglandine E2
PRED	prednisone
SMOADs	<i>symptom modifying osteoarthritis drugs</i> , médicament modifiant les symptômes de l'ostéoarthrose
TA	<i>triamcinolone acetonid</i> , acétonide de triamcinolone
TH	<i>triamcinolone hexacetonid</i> , hécacétonide de triamcinolone
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i> , facteur de croissance transformant β
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloprotease</i> , inhibiteur tissulaire des métallo-protéases
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i> , facteur onconécrosant α

Remerciements

*A Monsieur le Professeur André Bisailon,
de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal,*
qui nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et d'accepter la
présidence de notre jury de mémoire.
Hommages respectueux.

*A Madame le Professeur Sheila Laverty,
de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal,*
Qui a inspiré ce travail, votre bienveillance, votre confiance, vos
encouragements et votre disponibilité auront été de précieux atouts pour sa
réalisation.
Nous vous remercions pour avoir rendu si passionnant notre internat et
notre résidence à l'Hôpital des Grands Animaux – Secteur Équin de la
FMV.
Puisse ce travail vous inspirer une quelconque satisfaction, nous vous
l'adressons néanmoins en gage de notre profonde reconnaissance.

*A Monsieur le Professeur Robin Poole,
du Shriners Hospital for Children, Mc Gill University*
Qui a inspiré ce travail, votre bienveillance, votre expertise et vos conseils
judicieux auront été de précieux atouts pour sa réalisation.
Puissiez-vous trouver dans ce travail le témoignage de notre sincère
admiration.

*A Madame le Professeur Christine Théoret
de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal*
Qui nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et d'accepter de
participer à notre jury de mémoire.

Introduction

Les injections IA de GC sont utilisées depuis des décennies, tant chez l'Homme que chez l'animal, pour soulager la douleur et réduire l'inflammation accompagnant les maladies arthritiques telle l'OA.

On estime actuellement l'incidence de l'OA dans la population humaine adulte au Canada à 10%. Une augmentation drastique de cette incidence est attendue avec le vieillissement de la population, chez l'Homme, mais aussi chez les animaux de compagnie, dont l'espérance de vie s'accroît. Chez les chevaux de course et de sport, l'OA est, de plus, responsable d'importantes pertes économiques.

Les moyens thérapeutiques actuellement disponibles pour contrer les effets des maladies arthritiques se limitent à des traitements capables de masquer les symptômes sans malheureusement permettre de ralentir voire de stopper leur évolution, traitements que l'on regroupe, dans le cadre de lutte contre l'OA, sous le nom de médicaments modifiant les symptômes de l'OA (SMOADs). Les GC sont d'excellents SMOADs. Afin d'obtenir des concentrations efficaces de GC au site d'action, soit l'articulation, et d'éviter les principaux effets secondaires rencontrés lorsqu'ils sont administrés systématiquement, leur injection *in situ*, soit par voie IA, a été développée. Cette technique est maintenant parfaitement maîtrisée. Une controverse existe sur les bienfaits des GC sur le cartilage, le constituant articulaire principalement affecté par les maladies arthritiques. De nombreuses interrogations subsistent sur les éventuels méfaits que pourraient avoir les injections IA répétées de GC sur le métabolisme cartilagineux, promouvant la dégradation et la destruction du cartilage articulaire plutôt que sa préservation et sa régénération. Des effets bénéfiques ainsi que délétères ont été rapportés.

L'amélioration des connaissances concernant l'architecture et le métabolisme du cartilage articulaire, le développement de nouvelles techniques d'études et de diagnostic, ont permis d'identifier plus finement l'impact réel des différents moyens thérapeutiques actuellement utilisés pour traiter les diverses maladies articulaires, dont l'OA. Parmi ces nouvelles techniques diagnostiques figurent les biomarqueurs des processus de remodelage

du cartilage. Produits issus du métabolisme cartilagineux, les biomarqueurs diffusent dans les fluides corporels, dont le liquide synovial. Ils peuvent y être dosés, permettant ainsi de saisir « sur le vif » et *in situ* les remodelages cartilagineux en cours.

L'objectif principal de notre étude est de déterminer, *in vivo*, chez le cheval, les effets sur le métabolisme cartilagineux de la TA, par l'étude de certains des biomarqueurs des processus de remodelage du cartilage, un GC fréquemment utilisé par voie IA dans le traitement des maladies arthritiques, tant chez le cheval que chez l'Homme.

Nos objectifs secondaires sont de vérifier les hypothèses suivantes :

- les principaux GC utilisés dans le traitement de l'OA ont des effets métaboliques mesurables similaires sur le cartilage articulaire *in vivo*,
- les biomarqueurs du métabolisme du cartilage sont un bon moyen pour suivre longitudinalement les effets métaboliques des médicaments sur le cartilage articulaire, et, *in extenso*, l'évolution des maladies articulaires et leur réponse aux traitements utilisés pour les contrôler.

Chapitre I : Recension de la littérature

I.1. L'articulation synoviale

Les articulations se distinguent les unes des autres par les capacités qu'elles ont d'assurer ou non la stabilité et la mobilité du squelette (*Dewire and Einhorn 2001*). L'articulation synoviale, ou diarthrose, se distingue des autres types d'articulations, synarthroses et amphiarthroses, par ses capacités à générer des mouvements contrôlés de grande amplitude permettant les fonctions de locomotion et de préhension (*Barone 1980*). L'articulation synoviale se caractérise macroscopiquement par différentes structures : deux extrémités osseuses de forme le plus souvent complémentaire recouvertes de cartilage, une membrane synoviale délimitant un espace clos renfermant un liquide synovial aux propriétés lubrifiantes, des éléments de contention et de stabilisation tels que capsule, ménisques, ligaments, tendons et muscles. Ces structures sont inter-dépendantes les unes des autres, tant sur le plan anatomique, physiologique que fonctionnel, d'où l'analogie faite fréquemment entre l'articulation synoviale et les organes (*Dewire and Einhorn 2001; Radin 2001*).

I.1.1. La membrane synoviale

La membrane synoviale est un tissu conjonctif vascularisé de quelques μm d'épaisseur courant sous la capsule articulaire. Elle joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie de l'articulation, est responsable de la synthèse du liquide synovial et constitue l'un des piliers du système immunitaire articulaire. La membrane synoviale est principalement constituée d'un tissu conjonctif sub-synovial, renfermant tissu adipeux, fibroblastes, macrophages, mastocytes, cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, et de synoviocytes (*Antoniou et al. 1996*) posés en couche discontinue sur un endothélium vasculaire fenêtré leur servant de support (*Dewire and Einhorn 2001; Simkin 2001*).

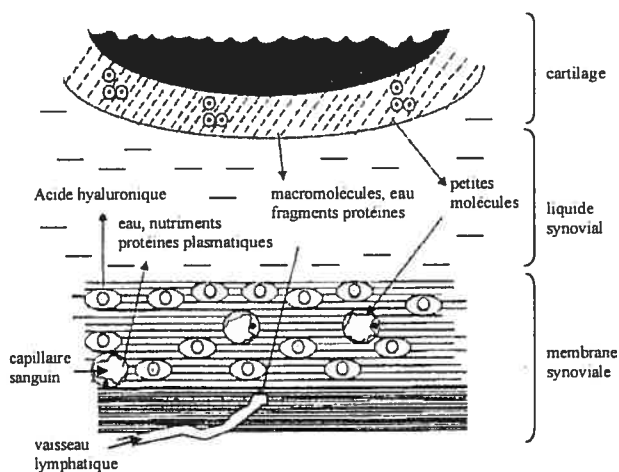
I.1.2. Le liquide synovial

Le liquide synovial, un ultrafiltrat du plasma sanguin produit par les synoviocytes de type B, joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie de l'articulation, la lubrification des surfaces articulaires et la nutrition des chondrocytes (*Müller-Ladner et al.*

2001). Acide hyaluronique (HA) et lubricine sont deux constituants propres du liquide synovial, non retrouvés dans le plasma, produits par les synoviocytes de type B, responsables de sa viscosité. La lubricine représente le premier système de lubrification de l'articulation, aussi appelé système de « lubrification limite » (Frankel 1998). Le second système, appelé « lubrification hydrodynamique », est généré par les mouvements à l'origine d'un film hydrique entre les surfaces articulaires (Simkin 1998; Simkin 2003). L'HA améliore la « lubrification dynamique ».

La cellularité du liquide synovial est faible ($<1 \times 10^6/\text{ml}$) (principalement des lymphocytes, des monocytes et des macrophages). Sa concentration en protéines totales est modérée (5 to 25 mg/ml) (principalement des petites protéines d'origine plasmatique, telle l'albumine) (Dewire and Einhorn 2001).

Figure 1 : Représentation schématique de la membrane synoviale, du liquide synovial et du cartilage articulaire montrant les différents échanges existant entre ces structures – selon *Garnero 2000*



I.1.3. Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hyalin quasi acellulaire, d'épaisseur limitée (quelques millimètres), dépourvu de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et de nerfs (Dewire and Einhorn 2001), recouvrant l'os sous-jacent, appelé os sous-chondral. Il est constitué d'une seule population cellulaire, les chondrocytes. Ces derniers produisent l'abondante matrice cartilagineuse extracellulaire, principalement constituée de collagène de type II (COLII) (spécifique au cartilage articulaire) et de protéoglycanes (PG). De concert avec le liquide synovial, le cartilage articulaire atténue les pressions importantes

auxquelles sont soumises les épiphyses. Il permet à celles-ci de glisser harmonieusement les unes par rapport aux autres (*Radin 2001*).

I.1.3.1. Les chondrocytes

Les chondrocytes proviennent de la différenciation de cellules mésenchymateuses (*Poole 2001*). Ils assurent la formation et l'entretien de la matrice cartilagineuse extracellulaire dans laquelle ils baignent, à partir des nutriments présents dans le liquide synovial (se reporter à la Figure 1) et qui leur parviennent par diffusion à travers la matrice. La diffusion de ces nutriments est facilitée par le mouvement, via le jeu des compressions et décompressions auquel est soumis le cartilage articulaire. L'activité métabolique des chondrocytes est élevée. Chez l'individu en croissance, les chondrocytes ont comme principale occupation l'accroissement progressif du volume de la matrice extracellulaire. Chez l'individu mature, ils se consacrent surtout à son entretien. Les chondrocytes occupent de 1 à 10 % du volume du cartilage selon l'âge et le type d'individu (en moyenne moins de 5% chez l'individu mature) (*Buckwalter and Mankin 1998; Poole 2001*).

Une diminution progressive du contenu cellulaire associée à une diminution de la synthèse de la matrice extracellulaire accompagne le vieillissement (*Poole 2001*).

I.1.3.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du cartilage articulaire est principalement constituée d'eau, de PG, de COLII, de quelques protéines et glycoprotéines. Son architecture, tout comme sa composition, varie de la surface articulaire à l'os sous-chondral. Les différences observées tiennent principalement à la forme et au volume des chondrocytes qui y résident, au diamètre, à l'orientation et à la concentration des fibres de collagène, à la concentration en PG et à la teneur en eau.

I.1.3.2.1. Eau

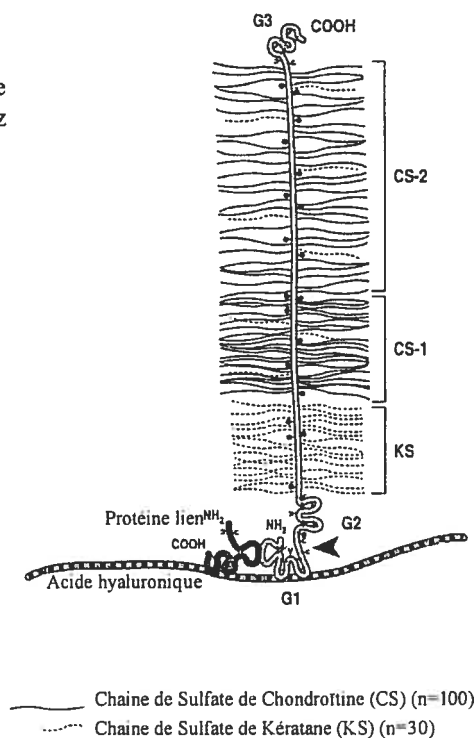
La matrice extracellulaire du cartilage articulaire contient de 65 à 80% d'eau (*Dewire and Einhorn 2001*). 33 % de cette eau est intracellulaire. Le reste est lié aux PG, protéines et glycoprotéines, molécules plutôt hydrophiles de nature. Le contenu en eau est maximal dans la couche superficielle du cartilage (80%). Il diminue progressivement au fur

et à mesure que l'on s'enfonce dans son épaisseur pour atteindre une valeur minimale dans la couche profonde (65%) (Poole 2001).

Le cartilage est habituellement subdivisé en quatre couches (superficielle, intermédiaire, profonde, calcifiée) qui diffèrent les unes des autres par leur architecture et leur teneur en eau, fibres de collagène, PG et chondrocytes (Poole et al. 2001).

I.1.3.2.2. Protéoglycane

Figure 2 : Structure d'un protéoglycane aggrégane nouvellement synthétisé chez l'Homme – selon Poole 2001



Les PG constituent 25 à 50 % de la matière sèche cartilagineuse. Leur concentration est minimale dans la couche superficielle. Elle augmente progressivement au fur et à mesure que l'on progresse vers la couche profonde (Dewire and Einhorn 2001). Les PG sont des macromolécules constituées d'une protéine centrale (protéine corps) (se reporter à la Figure 2) liée de façon covalente à des polysaccharides de taille variable appelés glycosaminoglycane (Gagliardo et al. 2001), à l'HA, via les domaines globulaires G1 et G2, ainsi qu'à d'autres molécules, telles que fructose ou galactose, via le domaine globulaire G3 (Poole 2001). Les GAG sont formés de longues chaînes linéaires de disaccharides se répétant. Trois types de GAG ont été identifiés au niveau cartilagineux :

sulfate de chondroïtine (CS), sulfate de kératane (KS), et sulfate de dermatane (*Buckwalter and Mankin 1998*).

Les protéoglycanes aggrécans (PGA) sont les principaux PG présents dans le cartilage articulaire. A leur protéine corps s'attachent, en région profonde (communément appelée région KS), de 20 à 50 chaînes de KS et, dans les régions plus superficielles (communément appelées régions CS-1 et CS-2) jusqu'à 100 chaînes de CS (*Poole et al. 1994; Dewire and Einhorn 2001; Poole 2001*) (se reporter à la Figure 2).

Les chaînes de CS et de KS, de par leur charge négative, développent de fortes interactions électrostatiques avec les molécules d'eau, conférant un fort pouvoir hydrophile aux PGA (*Dewire and Einhorn 2001*). Le fin réseau de fibres de collagène limite l'expansion de la matrice cartilagineuse extracellulaire par hydratation, générant sa turgescence. La matrice cartilagineuse extracellulaire confère au cartilage articulaire ses propriétés uniques de résistance aux forces de compression (*Mow and Ratcliffe 1997*), de déformation et de traction (*Mow and Hung 2003*) et assure une meilleure répartition des forces de pression (*Poole 2001*).

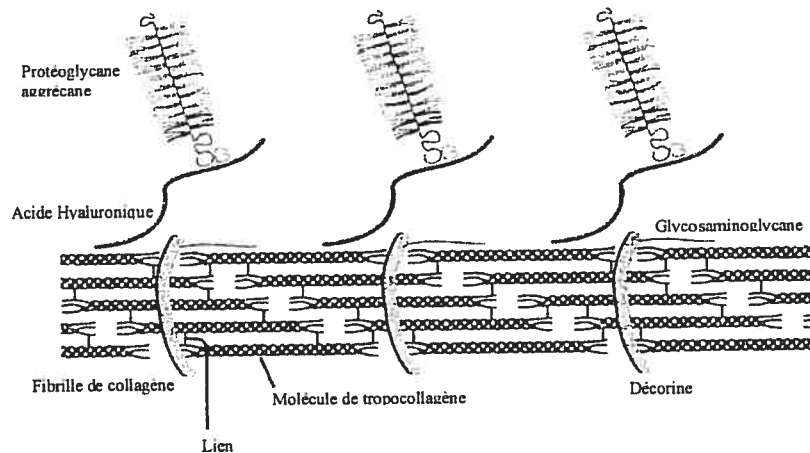
I.1.3.2.3. Collagènes

Les collagènes, tout type confondu, représentent de 15 à 30 % de la matière sèche du cartilage articulaire (*Poole et al. 2001; Radin 2001*) et forment un réseau fibrillaire similaire à un endosquelette (*Poole 2001*).

Le COLII prédomine (90-95%) (*Poole et al. 2001*). Ses fibres sont constituées de molécules de tropocollagène de type II, organisées en triple hélice de chaînes α , liées entre elles par des liens pyridinolines et hydroxypyridinolines. A leurs extrémités se trouvent des télopeptides amino et carboxy terminaux. Les fibres de COLII sont d'une longueur moyenne de 300 nm et d'un diamètre oscillant de 30 à 80 nm selon la position superficielle ou profonde qu'elles occupent dans le cartilage (*Poole et al. 2001*). Des fibres de collagène de type IX et XI se lient de façon covalente au COLII. Elles permettent l'assemblage et la stabilisation des fibres de COLII (*Mow and Ratcliffe 1997*) ainsi que l'adhésion des chondrocytes à la matrice cartilagineuse (*Kapyla et al. 2004*). Des fibres de collagène de type VI, capables de lier la décorine et l'HA, sont rencontrées en périphérie des chondrocytes. Elles permettent leur ancrage à la matrice cartilagineuse extracellulaire.

Enfin, à proximité de la couche de cartilage calcifié, des fibres de collagène de type X sont rencontrées. Elles joueraient un rôle dans la calcification du cartilage .

Figure 3 : Représentation schématique d'une fibre de collagène de type II – selon *Poole 2001*



I.1.3.2.4. Autres molécules

D'autres molécules entrent dans la composition du cartilage articulaire. Il s'agit principalement de protéines non collagéniques et de glycoprotéines (décorine, HA) (*Mow and Ratcliffe 1997*). Toutes n'ont pas encore été identifiées, et pour beaucoup, leur rôle reste à déterminer (*Buckwalter and Mankin 1998*).

I.1.4. Capsule et ligaments

La capsule articulaire et les ligaments sont des structures d'épaisseur et de position variables, pouvant être ou non indépendants, assurant la stabilité mécanique et fonctionnelle de l'articulation. Ces structures sont très similaires au niveau histologique, dans leur composition chimique et sur le plan de leur organisation tissulaire . Ils se composent d'eau (70 %), de fibres de collagène (principalement de type I (COLI)) organisées en faisceaux (90% de la matière sèche) enfermant des GAG différents de ceux rencontrés dans le cartilage (35% HA, 40% CS, 20% sulfate de dermatane). Ces fibres sont souvent investies d'un stroma fibro-cartilagineux se calcifiant à l'approche des insertions osseuses (*Radin 2001*).

I.2. L'ostéoarthrose : une maladie arthritique majeure

Les maladies arthritiques, dont la plus fréquemment rencontrée est l'OA, sont des maladies distinctes, d'étiologies variées, possédant cependant des similarités d'évolution au niveau biologique, morphologique et clinique (*Flores and Hochberg 2003*).

L'OA affecte l'ensemble des tissus articulaires. Elle résulte, le plus souvent, d'altérations répétées des équilibres métaboliques physiologiques. Lorsqu'elle se manifeste cliniquement (expression clinique variable), l'OA peut se caractériser par une sensibilité voire une douleur articulaire (d'intensité variable selon les espèces et les individus), une raideur plus accentuée des articulations, une limitation des mouvements, une effusion articulaire, une inflammation locale (*Brandt 2002; Flores and Hochberg 2003*). Elle est rarement accompagnée de symptômes généraux. A un stade avancé, l'OA affecte les cellules et la matrice extracellulaire de tous les tissus articulaires, qu'ils soient cartilagineux, synoviaux ou osseux (os sous-chondral). Elle conduit au ramollissement, à la fibrillation, à l'ulcération, à la perte du cartilage articulaire, ainsi qu'à la sclérose de l'os sous-chondral, au développement d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux.

L'OA a une forte prévalence, chez l'Homme (*Felson et al. 1997*) comme chez l'animal (*Trotter 1996; Johnston 1997*), prévalence qui chaque jour s'accroît (*Badley 2003; Felson et al. 2003*). Son incidence augmente avec l'âge (*Badley 2003; Pelletier and Martel-Pelletier 2003; Breedveld 2004*). Cette maladie semble plus affecter les individus de sexe féminin (*Badley 2003*), laissant présager une influence hormonale (*Sharma 2001*).

I.2.1. Pathogénie de l'ostéoarthrose

Les mécanismes exacts par lesquels les maladies arthritiques se développent sont mal connus (*Hough 2001*).

Les maladies arthritiques sont des maladies dégénératives complexes induites par divers facteurs (traumatiques, génétiques, métaboliques, congénitaux, hormonaux, environnementaux) (*Jouzeau et al. 2000; Flores and Hochberg 2003; Pelletier and Martel-Pelletier 2003*). L'importance relative de ces divers facteurs est sujette à controverse et toujours en cours d'évaluation.

Une polémique existe quant au tissu d'origine de l'OA (cartilage versus os sous-chondral). Certains pensent que la perte cartilagineuse, faisant suite à une inflammation engendrée par un dommage articulaire (*McGonagle and Emery 1999*), s'accompagnerait d'une protéolyse progressive avec perte des composants matriciels, centripète (*Squires et al. 2003*), de la lésion initiale vers les territoires cartilagineux adjacents, touchant initialement la couche superficielle (*Elsaid et al. 2003*) puis progressant plus profondément jusqu'à atteindre l'os sous-chondral (*Poole et al. 2002*). Cette protéolyse provoquerait l'amincissement du cartilage avant même que n'apparaissent les premiers signes de fibrillation cartilagineuse (*Poole et al. 2002*), amincissement à l'origine de profondes modifications des propriétés biomécaniques du cartilage articulaire. D'autres pensent qu'une atteinte primaire de l'os sous-chondral initierait le processus dégénératif.

On différencie deux formes principales d'OA : la forme spontanée (primaire) et la forme induite (secondaire). La forme induite, traumatique, semble la plus fréquente chez le cheval (*Trotter 1996*). Les formes spontanée et induite semblent de fréquence sensiblement égale chez le chien (*Johnston 1997*).

I.2.1.1. Métallo-protéases et autres enzymes protéolytiques

Diverses enzymes sont impliquées dans la pathogénie de l'OA et la protéolyse des composants matriciels (*Billingham et al. 1997; Shlopov et al. 1997; Freemont et al. 1999; Dahlberg et al. 2000; Poole 2001; Poole et al. 2001*). Parmi les enzymes impliquées, certaines sont d'importance car, en tant qu'acteurs majeurs du maintien de l'homéostasie cartilagineuse, leur déséquilibre et/ou leur activation entraînent nombre de conséquences.

Les PGA et le COLII sont clivés par deux types de protéases :

- les métallo-protéases (MMP) incluant les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-14 sont considérées comme les plus « dangereuses ») et la stromélysine-1 (MMP-3),
- les aggrecanases (ADAM TS 4 et ADAM TS 5), connues aussi sous le nom d'aggrecanase 1 et 2 (*Tortorella et al. 2001; Malfait et al. 2002; Poole et al. 2002*).

L'importance des aggrecanases reste à établir (*Poole et al. 2002*). MMP-3 a une affinité marquée pour les PGA (*Morris and Treadwell 1994; Balkman and Nixon 1998*) alors

que MMP-13 a une affinité prononcée pour le COLII (*Caron et al. 1996; Richardson and Dodge 2000; Poole et al. 2002*). MMP-13 semble, à ce jour, jouer le plus « grand rôle » dans la pathogénie de l'OA car elle s'attaque au « squelette » du cartilage articulaire en clivant le COLII (*Caron et al. 1996; Richardson and Dodge 2000; Poole et al. 2002*). Ce clivage induit une évolution phénotypique des chondrocytes. Ils se différencient et deviennent hypertrophiques, se spécialisant dans la production de collagène de type X et délaissant celle du COLII (*Poole 2001*). Cette différenciation est physiologiquement observée au niveau des plaques de croissance lors de l'ossification endochondrale (*Poole 2001; Mwale et al. 2002; Wu et al. 2002*). L'évolution phénotypique des chondrocytes s'accompagne d'une calcification du cartilage articulaire, d'une surproduction / activation des MMP dont MMP-13 (*Stoop et al. 1999; Poole 2001*), et d'une apoptose cellulaire, fréquemment observée dans le cartilage ostéoarthritique (*Hashimoto et al. 1998*). Le cartilage est ainsi transformé en une structure peu malléable, inadaptée.

I.2.1.2. Cytokines

Les enzymes protéolytiques, MMP et aggrecanases, sont naturellement produites sous forme inactive par les chondrocytes. Lors d'injure, des fragments de COLII et de fibronectine vont stimuler les chondrocytes. En réponse, ces derniers vont produire des cytokines dites inflammatoires, tel l'interleukine-1 (IL-1) ou le Tumor Necrosis Factor (TNF) α , et accroître le nombre de leurs récepteurs spécifiques à ces cytokines (*Poole 2001*).

Les cytokines inflammatoires favorisent la production de médiateurs inflammatoires (cyclo-oxygénase 2 (COX-2), prostaglandine E2 (PGE2), oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS)), et stimulent la production et l'activation des enzymes protéolytiques. Les chondrocytes vont, en parallèle, diminuer leur synthèse de COLII et de PGA (*Richardson and Dodge 2000*), principaux composants matriciels. Les cytokines inflammatoires et leurs récepteurs sont d'une importance majeure. Le blocage des uns ou des autres annihile drastiquement leurs effets délétères (*Kobayashi et al. 2005*).

Une cytokine non-inflammatoire, le Transforming Growth Factor β (TGF- β), a l'importance inverse : elle régule le turn-over des composants matriciels et permet le

maintien de l'homéostasie cartilagineuse. Une altération de production ou une modification de ses récepteurs provoque une dégénérescence cartilagineuse (*Serra et al. 1997; Goldring 2000; Goldring 2002*).

I.2.1.3. Inhibiteurs des métallo-protéases

Les MMP ont des inhibiteurs tissulaires appelés TIMP. Ces TIMP jouent un rôle majeur : ils contrecarrent les effets des MMP en se liant à elles et en les inactivant. Plusieurs études ont rapporté des corrélations positives directes entre la concentration de ces inhibiteurs et certains marqueurs de l'activité anabolique cartilagineuse (épitopes CS 846 et CP II) (se reporter au chapitre I.2.3.2.2.) (*Ishiguro et al. 1999; Ishiguro et al. 2001*).

Une balance harmonieuse entre les MMP et leurs inhibiteurs est nécessaire au maintien de l'homéostasie cartilagineuse. Cette balance est effective dans le cartilage sain. Des études menées principalement *in vitro* ont démontré, que, lors de maladie articulaire inflammatoire, cette balance n'est plus effective, que la stimulation par les cytokines inflammatoires de la production des MMP est plus grande que celle des TIMP (*Richardson and Dodge 2000*) (*Richardson and Dodge 2003*), favorisant les processus de dégradation.

I.2.1.4. Composants matriciels

Le métabolisme cartilagineux, principalement chondrocytaire, est un processus actif et permanent. Il diffère d'une région du cartilage à l'autre, d'un composant du cartilage à l'autre, d'un individu à l'autre, d'un état pathologique à l'autre. Beaucoup d'études ont été faites à partir de tissus provenant de patients souffrant d'OA avancée, peu sur des tissus provenant de patients souffrant d'OA précoce.

Le développement et la progression de l'OA s'accompagnent d'une modification progressive du rapport synthèse/dégradation des composants matriciels (*Rizkalla et al. 1992; Nelson et al. 1998; Aigner et al. 2002*). Les modèles étudiés ont mis en évidence, lors d'OA primaire ou secondaire, une augmentation du turnover du COLII et des PGA (*Adams et al. 1995; Matyas et al. 1995; Matyas et al. 1997; Matyas et al. 1999; Squires et al. 2003*). Ces augmentations de turnover semblent malheureusement insuffisantes ou inadéquates (synthèse de composants matriciels anormaux ou endommagés (*Rizkalla et al.*

1992; Dahlberg et al. 2000). Elles ne permettent pas d'enrayer complètement la protéolyse enzymatique. Les chances de réparation/guérison cartilagineuse sont donc compromises, une réduction progressive de l'intégrité structurelle matricielle s'observe.

De récentes études, menées chez l'Homme, ont rapporté, qu'il semble exister des inter-relations entre synthèse et dégradation des principaux composants de la matrice cartilagineuse extracellulaire (Garnero et al. 2002; Squires et al. 2003)

I.2.2. Évaluation clinique du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire subit de profondes transformations lorsque les maladies arthritiques s'installent, transformations souvent irréversibles pouvant conduire à sa disparition complète.

Les méthodes d'évaluation clinique du cartilage articulaire sont nombreuses et imparfaites, en particulier lorsque les maladies arthritiques tel l'OA sont à un stade précoce et/ou sont encore asymptomatiques (Jouzeau et al. 2000).

Une méthode d'évaluation clinique idéale du cartilage articulaire lors d'OA permettrait :

- 1/ un dépistage précoce de la maladie,
- 2/ une évaluation précise de la vitesse d'évolution de la maladie,
- 3/ une estimation rapide de l'efficacité du traitement instauré sur la progression de la maladie (Poole 2003).

Aucune méthode d'évaluation clinique du cartilage articulaire actuellement disponible ne permet cela. Chacune de celles disponibles apporte des informations différentes, intéressantes, complémentaires. Chacune a ses limites.

De nouvelles méthodes diagnostiques sont actuellement à l'étude, imagerie par résonance magnétique (Pelletier and Martel-Pelletier 2003; Batiste et al. 2004), tomographie assistée par ordinateur (Batiste et al. 2004), dosage de biomarqueurs physiopathologiques (Kojima et al. 2001; Poole 2003; Poole et al. 2003). Elles semblent prometteuses.

I.2.2.1. Évaluation macroscopique directe *in vivo*

I.2.2.1.1. Radiographie

La radiographie est une des méthodes d'évaluation du cartilage articulaire parmi les plus utilisées et parmi les plus controversées dans le suivi de l'OA. Le cartilage articulaire n'étant pas radiovisible, la radiographie ne permet pas de l'évaluer directement. Elle permet d'évaluer les structures osseuses avoisinantes, de mettre en évidence les lésions osseuses accompagnant la plupart des maladies arthritiques avancées que sont ostéophytes, entésiophytes, kystes osseux, plages d'ostéolyse, rétrécissements des espaces articulaires, sclérose osseuse ... lésions souvent utilisées pour attribuer un score lésionnel osseux aux affections articulaires chez l'Homme. Il existe plusieurs méthodes de calcul du score lésionnel (*Bellamy and Watson Buchanan 2001*). Beaucoup sont sujettes à controverse, tel le suivi du rétrécissement articulaire à des fins pronostiques (une extension méniscale pouvant la provoquer), par manque de reproductibilité. Les lésions osseuses radiologiquement visibles sont, de plus, souvent d'apparition tardive dans le processus pathologique, et, rarement corrélées aux symptômes cliniques.

Même si elle demeure à ce jour LA méthode de référence, la radiographie est une méthode d'évaluation incomplète et tardive des affections articulaires évolutives.

I.2.2.1.2. Échographie

L'échographie articulaire permet d'évaluer les irrégularités de surface du cartilage articulaire (tels qu'érosions superficielles, « flap » cartilagineux, absence complète de cartilage et kyste osseux), ses variations d'épaisseur, son homogénéité, son intégrité. Elle permet aussi d'évaluer la membrane synoviale et certaines structures intra ou péri articulaires (mêmes paramètres). L'échographie ne permet d'évaluer l'os sous-jacent que très superficiellement (intégrité de la partie superficielle du cortex osseux).

Cette méthode d'évaluation du cartilage articulaire, actuellement en développement, semble cliniquement prometteuse (*Bellamy and Watson Buchanan 2001; Spriet et al. 2005*). Elle a cependant certaines limites. Seules les régions articulaires facilement accessibles sont évaluables par échographie directe avec contact cutané ou par biomicroscopie échographique par arthroscopie (méthode expérimentale).

I.2.2.1.3. Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet, contrairement aux techniques précédemment décrites, de visualiser directement et simultanément toutes les composantes d'une articulation, cartilage articulaire compris (*Peterfy and Genant 2001; Peterfy 2003; Batiste et al. 2004; Batiste et al. 2004*). L'utilisation conjointe d'un produit de contraste, comme le gadolinium, qui permet de détecter précocement les pertes en PGA, affine la technique (*Bashir et al. 1996; Nieminen et al. 2004; Nissi et al. 2004*).

Son coût et son accessibilité limitent son utilisation.

I.2.2.1.4. Arthroscopie

L'arthroscopie, technique chirurgicale désormais standardisée, est une méthode d'évaluation nolisée et de choix lorsque l'on souhaite apprécier la cavité synoviale dans son intégralité. L'arthroscopie présente nombre d'avantages (évaluation directe *in situ* du cartilage articulaire, accessibilité) et de désavantages (coût, exploration limitée d'une articulation donnée, apport limité d'informations sur les changements cartilagineux microscopiques ou métaboliques, caractère invasif, obstacle majeur aux études longitudinales).

Malgré cela, l'arthroscopie demeure LA méthode d'évaluation macroscopique *in vivo* de choix du cartilage articulaire (*Kalunian et al. 2001*).

Les méthodes d'évaluation clinique que nous venons de voir sont des techniques d'imagerie peu à pas invasives, permettant de mettre en évidence certaines conséquences du ou des processus pathologiques affectant le cartilage articulaire ou certains de ses composants. Afin de comprendre et prévenir ces conséquences, comprendre et mesurer les processus moléculaires qui y ont mené, des techniques plus invasives s'avèrent nécessaires.

I.2.3.2. Évaluation macroscopique et microscopique indirecte *in vivo*: analyse du liquide synovial

Le prélèvement de liquide synovial, ou arthrocentèse, est techniquement simple à réaliser. C'est un des examens cliniques de base réalisé lors de suspicion d'affection articulaire.

Les échanges entre cartilage articulaire et liquide synovial étant constant, de nombreux paramètres, reflet du ou des processus pathologiques affectant le cartilage, peuvent être analysés dans le liquide synovial.

I.2.3.2.1. Paramètres de l'inflammation

De nombreux paramètres de l'inflammation sont régulièrement évalués dans le liquide synovial lors de suspicion d'affection articulaire. Les principaux appréciés sont : la fluidité, la couleur, la turbidité du liquide synovial, le volume, la concentration synoviale en protéines totales, les leucocytes, incluant leur différentiel, les cytokines, l'HA ainsi que la présence de fragments cartilagineux (*Caron 1999*).

I.2.3.2.2 Biomarqueurs du métabolisme cartilagineux articulaire

Des méthodes d'analyses immunologiques, sensibles et spécifiques, permettant de quantifier de petites molécules biologiques appelées biomarqueurs, ont été récemment développées (*Poole 2003*). Les biomarqueurs sont les produits d'évènements moléculaires tissulaires spécifiques survenant lors de dommages articulaires. Ils reflètent les processus de dégradation, de synthèse, de remodelage du cartilage et/ou des autres structures articulaires en cours dont ils sont en quelque sorte des « déchets ». Ils peuvent aussi être les témoins d'une inflammation systémique ou articulaire associée aux maladies arthritiques (*Poole 2003*). Les biomarqueurs diffusent dans l'organisme : ils peuvent être dosés dans le tissu source (cartilage par exemple) et dans certains fluides corporels comme le sang périphérique, l'urine et le liquide synovial.

De par leur survenue rapide au « site d'action » lorsque l'« action » se déclenche, les biomarqueurs pourraient représenter LA méthode d'évaluation clinique idéale du cartilage articulaire, permettant :

- 1/ un dépistage précoce des maladies,
- 2/ une évaluation précise de la vitesse d'évolution des maladies,
- 3/ une estimation rapide de l'efficacité du traitement instauré sur la progression des maladies (*Poole 2003*).

Les biomarqueurs de la synthèse ou de la dégradation cartilagineuse témoignent des processus métaboliques en cours au sein du cartilage articulaire au moment du prélèvement du tissu ou fluide corporel. Ils sont d'apparition rapide (*Matyas et al. 2004*). Leur évolution semble positivement corrélée à celles de certains autres paramètres diagnostiques, en particulier radiographiques, plus lents d'apparition, mais depuis longtemps utilisés. Ils permettraient même de les prédire (*Garnero et al. 2002; Landewe et al. 2004*).

Bien qu'encore en phase d'étude et de développement, un consensus se dessine quant à la technologie des biomarqueurs du métabolisme cartilagineux et les opportunités qu'ils offrent de détecter précocement et de mesurer adéquatement les processus de dégradation et de synthèse du cartilage articulaire en cours. Ils permettraient ainsi :

- une évaluation globale du cartilage articulaire d'une articulation ciblée (dosage dans le liquide synovial) ou de l'ensemble des articulations (dosage dans le sang ou l'urine),
- une description plus fine et une meilleure compréhension de la pathogénie des maladies articulaires,
- un diagnostic précoce des maladies articulaires,
- la mise en place de thérapies adaptées à la maladie diagnostiquée, l'évaluation de la réponse thérapeutique et l'ajustement du traitement,
- l'établissement d'un pronostic plus précis et la prévision de l'évolution de la maladie.

Chez le cheval, des facteurs tels l'âge (*Jackson et al. 2003*), l'exercice (*Price et al. 1995; Vervuert et al. 2002; Billinghamurst et al. 2003; Jackson et al. 2003; Billinghamurst et al. 2004*), l'administration concomitante de médicaments (*Robion et al. 2001*) ou une pathologie cartilagineuse (*Laverty et al. 2000; Fuller et al. 2001; Laverty et al. 2002; Billinghamurst et al. 2004*) modifient significativement les concentrations en biomarqueurs cartilagineux.

Des relations directes entre certains d'entre eux (produits issus du turnover des composants matriciels et marqueurs moléculaires de l'inflammation) ont été rapportées (*Fraser et al. 2003*).

I.2.3.2.2.1. Biomarqueurs du métabolisme des protéoglycanes

L'hydratation des PGA et leur turgescence confèrent au cartilage articulaire sa résistance aux forces de compression et de déformation. Leur structure moléculaire est particulière (se reporter au chapitre I.1.3.2.2.)

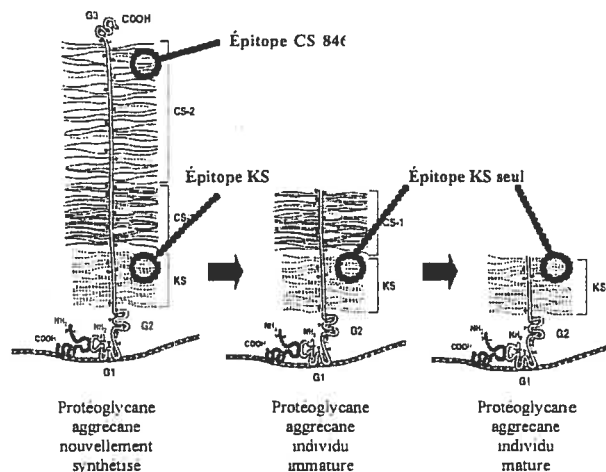
I.2.3.2.2.1.1. Biomarqueurs de dégradation

La protéine centrale des PGA peut être clivée par deux familles d'enzymes protéolytiques : les MMP et les aggrecanases. Le clivage peut se produire soit proche de l'extrémité carboxy-terminale, soit dans la région interglobulaire G1-G2. Parmi les produits issus de ce clivage (se reporter au Tableau I) existe le biomarqueur KS, épitope se localisant normalement dans les parties KS1 et KS2 des PGA résidents (se reporter au chapitre I.1.3.2.2.)

Épitope KS

Des modifications dans la concentration tissulaire de cet épitope reflètent une

Figure 4 : Localisation des biomarqueurs du métabolisme des protéoglycanes aggrecanes – selon Poole 2001



modification du turnover (principalement dégradation) des PGA (Thonar *et al.* 1985; Sweet *et al.* 1988; Manicourt *et al.* 1991; Otterness *et al.* 2001; Poole 2001; Lohmander 2002). Initialement identifié dans le sérum des patients souffrant d'OA (Thonar *et al.* 1985; Sweet *et al.* 1988; Bleasel *et al.* 1999) il a ensuite été identifié dans le liquide synovial de patients atteints d'OA (Campion *et al.* 1991; Manicourt *et al.* 1991). Sa concentration synoviale augmente lors de l'administration IA de certaines drogues (Robion *et al.* 2001). Les études

divergent sur la corrélation (*Fraser et al. 2003*) ou non (*Matyas et al. 2004*) des variations de concentration de cet épitope avec l'épitope CS 846, autre marqueur du turnover des PGA.

I.2.3.2.2.1.2. Biomarqueurs de synthèse

Des analyses immunologiques ont montré qu'il existe des modifications structurales des PGA au niveau des régions CS (épitopes 7D4, 3B3 et 846) (se reporter au Tableau I) (se reporter à la Figure 4) chez les patients adultes atteints de maladies arthritiques lorsqu'on les compare à ceux de patients adultes sains. Fait intéressant, ces épitopes sont aussi présents lors du développement, disparaissent chez l'adulte sain (se reporter à la Figure 4) et réapparaissent lors d'OA. Par conséquent, la réapparition de ces épitopes reflète une altération du métabolisme matriciel s'accompagnant d'une synthèse accrue de PGA (*Poole et al. 2003*).

Épitope CS 846

L'épitope sulfate de chondroïtine 846 (CS 846) se localise dans la partie CS des larges PGA nouvellement synthétisés (se reporter au chapitre I.1.3.2.2.) (se reporter à la Figure 4).

Sa concentration tissulaire, tout comme celle de l'épitope 3B3, est plus importante dans le cartilage fœtal, où il a été pour la première fois isolé (*Glant et al. 1986; Antoniou et al. 1996*), ainsi que dans le cartilage immature (*Thonar and Manicourt 2001*) et le cartilage ostéoarthritique (*Rizkalla et al. 1992; Lohmander et al. 1999*) chez l'Homme.

Sa concentration dans le liquide synovial diminue avec la croissance chez le cheval (*Billinghurst et al. 2003; Billinghurst et al. 2004*), et dans les phases avancées d'OA chez l'Homme (*Ishiguro et al. 2001*). Elle augmente suite à une déstabilisation articulaire (*Chu et al. 2002*) et lors d'OA induite en phase précoce chez le chien (*Matyas et al. 2004*), ou, lors d'administration IA de GC chez le cheval (*Robion et al. 2001*). Lors de fragmentation ostéochondrale chez le cheval, les variations de concentration synoviale de cet épitope sont controversées (*Frisbie et al. 1999; Laverty et al. 2000*).

Des modifications dans la concentration tissulaire et synoviale de cet épitope reflètent une modification du métabolisme (synthèse/dégradation) des PGA (*Poole et al.*

1994; Mansson et al. 1995; Lohmander et al. 1999; Poole 2001; Lohmander 2002). Ses variations de concentration sont positivement corrélées avec celles de CP II (se reporter au chapitre I.4.2.2.2.2.) et celles de GAG dans le cartilage péri-lésionnel lors d'OA phase précoce (Squires et al. 2003) et chez les patients atteints d'OA traumatique (Lohmander et al. 1999), suggérant une augmentation concomitante de la synthèse des composants matriciels (PG, collagène) dans l'OA, un mécanisme probable de réparation des dommages causés (Lohmander et al. 1999).

I.2.3.2.2.2. Protéine oligomérique du cartilage COMP

Cette protéine, de la famille des thrombospondines, synthétisée, entre autres, par les chondrocytes et les synoviocytes, lie les collagènes (types I, II et IX). Les cytokines pro-inflammatoires stimulent sa production (Recklies et al. 1998). Une concentration augmentée de la protéine native dans le liquide synovial chez le cheval serait le reflet d'ostéochondrose, celle de fragments de COMP ou une plus faible concentration de COMP native d'arthrite (Misumi et al. 2002; Arai et al. 2005; Skioldebrand et al. 2005).

I.2.3.2.2.3. Biomarqueurs du métabolisme du collagène de type II

Le cartilage articulaire, tout comme la plupart des cartilages hyalins, est constitué d'une abondante matrice extracellulaire sécrétée et entretenue par les chondrocytes. Le principal composant de cette matrice est le COLII organisé en un abondant et fin réseau de fibres. Il procure au cartilage articulaire sa résistance aux forces de tension, sa possibilité de répartition des charges portées, et sa déformabilité minimale réversible (Poole 2001) (se reporter au chapitre I.1.3.2.3.).

I.2.3.2.2.3.1. Biomarqueurs de dégradation

Dans les maladies arthritiques, un clivage extensif et progressif du COLII se produit. Les collagénases clivent la triple hélice, les télopeptides terminaux et les liens inter-fibrilles ; elles génèrent des néo-épitopes aux sites de clivage, libérant ainsi nombres de produits de déchets ou biomarqueurs (se reporter au Tableau I).

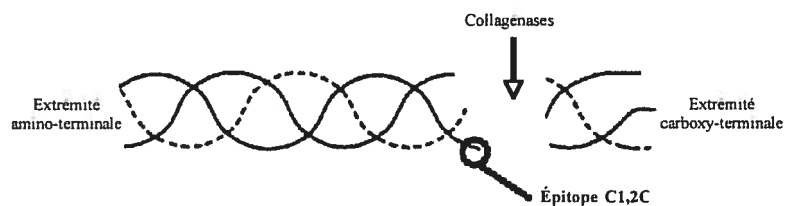
Épitope C1,2C

L'épitope C1,2C, néo-épitope carboxy-terminal des collagènes de type I et II, plus connu sous le nom d'épitope COL-2-3/4C_{short-mono}, est exposé aux sites de clivage de la triple hélice par les collagénases, puis clivé et libéré dans les fluides corporels (liquide synovial, sang, urine) (se reporter à la Figure 5).

On le retrouve en quantité augmentée dans le liquide synovial lors de dégradation des collagènes de type I et II par les collagénases dans l'OA expérimentale (*Billinghurst et al. 1997; Thonar and Manicourt 2001*) ainsi que chez les chevaux souffrant d'ostéochondrose précoce (*Billinghurst et al. 2004*). Sa concentration semble alors positivement corrélée à la sévérité des lésions (*Billinghurst et al. 2004*).

L'épitope C1,2C est un biomarqueur de la dégradation des collagènes de type I et II (se reporter au Tableau I)

Figure 5 : Épitope C1,2C libéré par l'action des collagénases sur l'extrémité carboxy-terminale du collagène de type II – selon *Poole 2001*



I.2.3.2.2.3.2. Biomarqueurs de synthèse

Lorsque le cartilage dégénère, ou est accidentellement traumatisé, les chondrocytes accentuent leurs activités de synthèse, incluant celle du COLII, afin de compenser les dommages (*Poole 2001*). Le COLII est synthétisé et sécrété sous forme de procollagène.

Épitope CP II

Les chondrocytes synthétisent le tropocollagène de type II (se reporter à la Figure 6). Avant son incorporation dans la fibrille de COLII, le tropocollagène de type II subit des clivages à ses extrémités amine et carboxyle par des protéases. Ces clivages libèrent un propeptide-C carboxy-terminal de tropocollagène de type II, plus connu sous le nom d'épitope CP II (*Poole 2001*) (se reporter à la Figure 7 et au Tableau I).

La concentration en épitope CP II dans le liquide synovial est étroitement corrélée à la synthèse de COLII (*Shinmei et al. 1992; Nelson et al. 1998*). Elle tend à s'accroître

significativement avec l'âge (*Billinghurst et al. 2004*), lors de trauma articulaire, d'OA expérimentale primaire (*Lohmander et al. 1996*) ou secondaire (*Matyas et al. 2004*), ainsi que lors d'ostéochondrose clinique (*Laverty et al. 2000; Billinghurst et al. 2004*).

Sa concentration serait alors positivement corrélée à la sévérité des lésions (*Laverty et al. 2000; Billinghurst et al. 2004*). La concentration sérique en CPII est plus élevée chez les animaux que chez l'Homme (*Robion et al. 2001*). Une étude expérimentale utilisant un modèle animal d'OA a rapporté une concentration sérique de CP II supérieure à celle synoviale après création d'une instabilité articulaire (*Matyas et al. 2004*). Cette différence, non attendue, mais significative, suggère qu'un trauma articulaire pourrait induire une réponse systémique du métabolisme du collagène. Une réserve doit cependant être émise : peu de choses sont actuellement connues sur la « pharmacologie », qu'elle soit sérique ou synoviale, des biomarqueurs (*Myers et al. 1996; Lohmander et al. 1999; Myers et al. 2000*). Seule une demi-vie estimée de CP II est disponible : 16 à 18 heures en culture cellulaire (*Nelson et al. 1998*).

Sa concentration sérique diminue significativement chez les chevaux entraînés en bas âge (*Billinghurst et al. 2003*).

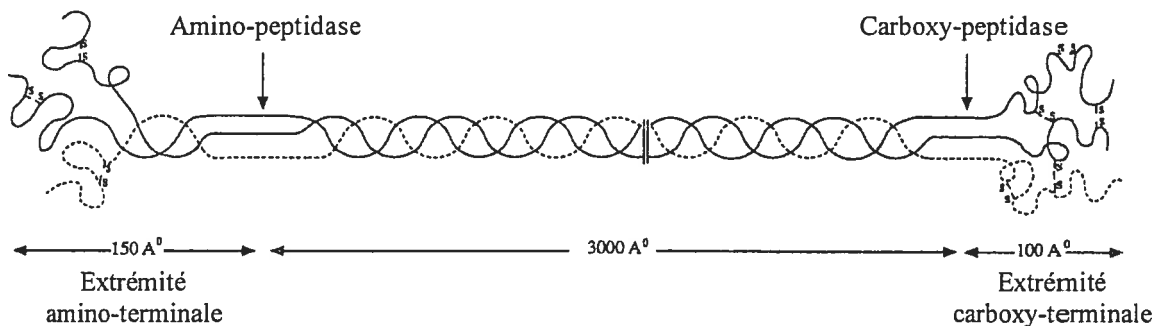


Figure 6 : Structure du procollagène de type II montrant les sites de clivage par les métalloprotéases – selon *Poole 2001*

Figure 7 : Épitope CPII libéré par l'action de la carboxypeptidase sur l'extrémité carboxy-terminale du procollagène de type II – selon *Poole 2001*

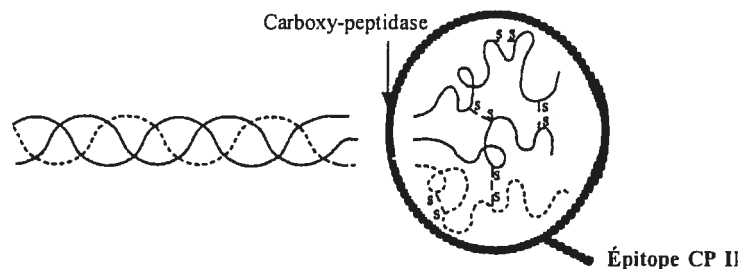


Tableau I : Biomarqueurs du métabolisme du cartilage articulaire

Métabolisme cartilagineux	Synthèse	Dégradation
<p>Protéoglycane Aggrécane</p>	<p>Sulfate de Chondroïtine (CS) :</p> <p>846 (Rizkalla et al. 1992; Poole et al. 1994)</p> <p>3B3 (Ratcliffe et al. 1993; Hazell et al. 1995; Vankemmelbeke et al. 1998; Baitch et al. 2000)</p> <p>7D4 (Hazell et al. 1995)</p> <p>Δdi-CS6, Δdi-CS4 (Mourao 1988; Ishiguro et al. 1999)</p>	<p>Fragments de la protéine corps (Saxne et al. 1985)</p> <p>Sulfate de Kératine (KS) :</p> <p>5D4 (Cateron et al. 1983; Thonar et al. 1985; Sweet et al. 1988; Hazell et al. 1995; Bleasel et al. 1999; Fuller et al. 2001)</p> <p>AN9P1 (Poole et al. 1989)</p>
<p>Collagène de type II</p>	<p>Propeptides du procollagène de type II :</p> <p>PIICP = CPII (Mansson et al. 1995; Lohmander et al. 1996; Nelson et al. 1998)</p> <p>PIIANP (Sandell et al. 1991; Aigner et al. 1999; Garnero et al. 2002)</p>	<p>Pyridinoline et Dihydroxyypyridinoline (Eyre et al. 1984; Eyre et al. 1988; Gough et al. 1994)</p> <p>Chaines α du collagène de type II</p> <p>Télopeptides C (Col2CTx) et N du collagène de type II (Garnero et al. 1999; Garnero et al. 2000)</p> <p>Néoépitopes du collagène de type II :</p> <p>COL2-3/4C_{long} mono ou CIIC (Dodgson and Poole 1989; Maryas et al. 2004)</p> <p>COL2-3/4C_{short} ou C1,2C (Billinghurst et al. 1997)</p> <p>COL2-1/4N1 (Petersson et al. 1998)</p> <p>COL2-1/4N2 (Billinghurst et al. 1997; Vankemmelbeke et al. 1998)</p>
<p>Protéines non aggrécane et non collagéniques</p>	<p>YKL-40 (Takala et al. 1993; Johansen et al. 1993; Johansen et al. 1996; Harvey et al. 1998)</p>	<p>Fragments de COMP (Saxne and Heinegard 1992; Lohmander et al. 1994; Sharif et al. 1995; Billinghurst et al. 1997; Rosenberg et al. 1998; Vankemmelbeke et al. 1998; Clark et al. 1999)</p>

I.2.4. Avenues de traitement

Les maladies articulaires dégénératives, comme l'OA, ont toutes une base inflammatoire. La réponse inflammatoire contrôlée est une réponse normale et indispensable à toute forme d'injure. Lorsqu'elle est non contrôlée, au lieu de limiter les effets de l'injure subie et faciliter les processus de guérison, la réponse inflammatoire engendre des effets négatifs pouvant être destructeurs. On considère la réponse inflammatoire non contrôlée comme un des événements majeurs menant à la dégradation de la matrice cartilagineuse extracellulaire (*Goldring and Goldring 2004; Schurman and Smith 2004*).

Comme nous l'avons vu, lors d'injure, en réponse à certains stimuli, les chondrocytes vont produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α), accroître leur réceptivité à ces molécules (*Poole 2001*), et atténuer leur synthèse de composants matriciels (*Richardson and Dodge 2000*). Ces cytokines, dont on pense qu'elles sont la pierre angulaire des processus de dégradation, vont favoriser la production de médiateurs inflammatoires (COX-2, PGE2, iNOS), stimuler et activer les enzymes protéolytiques (MMPs).

Les moyens de traitement actuels visent à bloquer la production de médiateurs inflammatoires et à soulager les symptômes (SMOADs). Les nouvelles avenues thérapeutiques visent à agir plus en amont dans la cascade de l'inflammation, afin d'arrêter ou renverser la destruction cartilagineuse (DMOADs).

I.2.4.1. Moyens thérapeutiques actuels : les anti-douleurs

Les prostaglandines, en particulier celles de la lignée E, sont étroitement associées à l'inflammation synoviale, la douleur et la dégradation de la matrice cartilagineuse. Parmi celles-ci, la prostaglandine E2 joue un rôle majeur dans la surproduction d'enzymes protéolytiques par les chondrocytes (*Steinberg and Sledge 1991; Mehindate et al. 1996*).

Les prostaglandines sont produites par l'action des cyclooxygénases (COX) sur l'acide arachidonique. Il existe deux isoformes de COX. Ces deux isoformes ont des propriétés physiologiques majeures différentes. Le premier isoforme, ou COX-1, est naturellement produit par l'organisme (on le dit constitutif). Il permet le maintien homéostatique de certaines grandes fonctions organiques. La toxicité de certaines drogues

(en particulier digestive et rénale) utilisées pour lutter contre l'inflammation serait principalement consécutive à l'inhibition de cet isoforme. Le second isoforme, ou COX-2, est principalement induit par la cascade inflammatoire (on le dit inductible car sa production se décuple lors d'inflammation). Il induit la synthèse de grandes quantités de prostaglandines, en particulier PGE2 (*Caron and Genovese 2003*).

Les prostaglandines ne produisent de la douleur que lorsqu'elles sont présentes en grande quantité (*Clark and Clark 1999*). La PGE2, en particulier, sensibilise les terminaisons nerveuses aux stimuli mécaniques et amplifie l'activation des récepteurs à la douleur par d'autres médiateurs inflammatoires, tels que la bradykinine et l'histamine, qui tendent à abaisser le seuil de douleur (*Bonica 1990*).

I.2.4.1.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS

La plupart des AINS bloquent l'activité des deux isoformes de COX. Cependant l'inhibition proportionnelle des isoformes COX-1 et COX-2 varie d'un composé à l'autre. Il existe des :

AINS non sélectifs : telle la phénylbutazone, qui réduit significativement la production de PGE2 (*Tung et al. 2002*) mais bloque préférentiellement l'expression génomique de l'isoforme COX-1 (d'où les effets secondaires gastro-intestinaux et rénaux souvent observés).

AINS inhibiteurs COX-2 préférentiels : qui diminuent préférentiellement la production de COX-2, moins celle de COX-1.

AINS inhibiteurs COX-2 sélectifs : qui diminuent sélectivement la production de COX-2 sans atténuer celle de COX-1 (celecoxib et rofecoxib). Ils ne préviennent cependant pas totalement les effets négatifs liés à la diminution de production de COX-1 (digestif, rénal) (*Lugardon et al. 2004*) (AINS prometteurs).

Aucune étude n'a rapporté d'éventuels effets sur l'intégrité cartilagineuse.

I.2.4.1.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les AIS sont parmi les plus puissants anti-inflammatoires utilisés dans le traitement de l'OA. Utilisés surtout localement, pour éviter les effets secondaires liés à leur utilisation à fortes doses par voie systémique pour obtenir des concentrations thérapeutiques locales

suffisantes, les AIS bloquent la production de prostaglandines en inhibant la phospholipase A2 et la COX-2 (mais pas directement la COX-1) (*Masferrer et al. 1994*). Ils inhibent la production de cytokines inflammatoires par les macrophages, telles l'IL-1, le TNF- α (*DiBattista et al. 1991; Amano et al. 1993*). Cette inhibition est d'une importance majeure car les cytokines inflammatoires induisent la synthèse et l'activation des MMP, ainsi que celle du iNOS, antagonisent les effets du TGF- β , et suppriment l'expression génique des composants matriciels et des TIMP. Les GC stimulent en parallèle la production d'autres cytokines, dites anti-inflammatoires, telles l'IL-10 par les macrophages et l'IL-4 et le TGF- β par les lymphocytes, qui contrecarrent les effets des cytokines inflammatoires telles l'IL-1 ou le TNF- α (*Boumpas and Wilder 2001*).

Leurs effets bénéfiques sont cependant controversés. Certains GC, à certaines doses, inhibent l'expression génique d'inhibiteurs enzymatiques d'importance (TIMP) ainsi que celles de composants matriciels essentiels (*Borden and Heller 1997; Richardson and Dodge 2000; Richardson and Dodge 2003*). Ils se pourraient donc qu'ils favorisent la dégradation et la destruction du cartilage articulaire (se reporter au chapitre I.3.).

I.2.4.1.3. Autres molécules

Acide hyaluronique : l'HA a de modestes effets analgésiques mais de bons effets anti-inflammatoires (*Tobetto et al. 1993; Ghosh 1994*). Il régule la production de prostaglandines (dont la PGE2) (*Yasui et al. 1992; Freaan and Lees 2000*) par les cellules articulaires et protège le cartilage des effets des radicaux libres et de certaines enzymes. Des effets inhibiteurs sur l'activité des MMPs ont été rapportés à de fortes doses (*Clegg et al. 1998*), effets qui restent cependant à prouver (*Lynch et al. 1998*).

I.2.4.2. Futures avenues de traitement

I.2.4.2.1. Modulations des cytokines pro-inflammatoires

Inhibiteurs directs: l'IL-1 induit la synthèse et l'activation des MMP, ainsi que celle du iNOS. Elle antagonise les effets du TGF- β et supprime l'expression génique des composants matriciels et des inhibiteurs des MMP (TIMP). Elle favorise ainsi la destruction de la matrice cartilagineuse extracellulaire et nuit à sa réparation. Une enzyme unique permet l'activation de l'IL-1 à partir de ses précurseurs : l'enzyme IL-1beta

convertissant (ICE) (*Pelletier et al. 2001*). Des inhibiteurs de cette enzyme ont récemment été développés chez l'Homme, qui semblent capable de la bloquer efficacement (pralnacasan) (*Laverty 2003*). Ces inhibiteurs pourraient à la fois être des SMOADs et des DMOADs.

Le TNF- α partage beaucoup des propriétés de l'IL-1 (dont une enzyme indispensable à son activation), mais à un moindre degré (*Pelletier et al. 2001*). Un inhibiteur de cette cytokine (infiximab) est actuellement disponible et semble très efficace, en particulier dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde (*St Clair et al. 2004*). Mais il ne semble pas dénué d'effets secondaires (*Dunlop 2004; Ferraro-Peyret et al. 2004*).

Inhibiteurs des récepteurs cytokiniques : des antagonistes des récepteurs à l'IL-1 et au TNF- α sont en cours d'études (etanercept) (*Laverty 2003*).

Stimulation des cytokines anti-inflammatoires : des recherches sont actuellement en cours pour trouver des moyens de surproduire localement certaines cytokines anti-inflammatoires (IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13) qui réduisent la production d'IL-1 et de TNF- α (*Pelletier et al. 2001*) et pourraient contrecarrer leurs effets.

I.2.4.2.2. Régulation de la dégradation des composants matriciels

Inhibiteurs des MMP : les inhibiteurs synthétiques des MMP (marimastat) limitent leurs effets sur les composants matriciels. Cependant, leur utilisation par voie systémique n'est pas dénuée d'effets secondaires, probablement par inhibition non sélective des MMP (*Mengshol et al. 2002*).

Antibiotiques : certains antibiotiques, tels la tétracycline et ses formes semi-synthétiques (doxycycline et minocycline) inhibent directement l'activité des MMP par chélation du zinc au niveau de leur site actif (*Pelletier et al. 2001*). Ils agiraient aussi sur leur expression génique (*Mengshol et al. 2002*).

I.2.4.2.3. Stimulation de la synthèse des composants matriciels

Facteurs de croissance : des facteurs de croissance, tels le TGF, l'IGF ou les BMP (bone morphogenetic proteins) ont été utilisés par voie systémique. Ils ont des effets prometteurs, mais ne sont pas dénués d'effets secondaires (TGF - production d'ostéophytes) (*Van*

Beuningen et al. 2000; Verdier et al. 2003). Des recherches sont en cours pour développer des moyens de délivrance locale.

Glucosamine et sulfate de chondroïtine : glucosamine et sulfate de chondroïtine sont actuellement des molécules d'une grande popularité. Leur utilisation vise à soulager et prévenir les symptômes des maladies articulaires dégénératives, et si possible à limiter leur évolution.

La glucosamine semble être un SMOADs, mais aucune étude ne prouve à ce jour qu'elle serait effectivement un DMOADs (*Schurman and Smith 2004*). Une étude récente, menée chez le cheval, a démontré que les concentrations de glucosamine obtenues *in vivo* localement (articulations), suite à une administration systémique aux doses recommandées chez l'Homme et le cheval, étaient de loin inférieures aux doses efficaces établies *in vitro* (*Laverty et al. 2005*). Le lien de cause à éventuel effet reste donc à établir.

Le sulfate de chondroïtine semble prometteur, seul ou en combinaison avec la glucosamine, mais son absorption et ses effets comme DMOADs restent à établir (*Schurman and Smith 2004*).

Thérapie génique : la thérapie génique permettant la surexpression locale de gènes codant pour certaines protéines (inhibiteurs des cytokines, composants matriciels) est actuellement en plein essor. Coût, efficacité et durée d'expression des gènes sont actuellement les principaux facteurs limitants (*Pelletier et al. 2001; Mengshol et al. 2002; Laverty 2003*).

À ce jour, en résumé, les DMOADs sont encore à l'essai, et seule l'activité des SMOADs a été scientifiquement prouvée par des études rigoureuses aux résultats concordants.

I.3. Glucocorticoïdes, articulations et cartilage articulaire

Les GC sont les plus puissants anti-inflammatoires utilisés dans le traitement des maladies arthritiques. Normalement injectés directement dans les articulations, ils réduisent nombre de processus inflammatoires tels que libération et activations d'enzymes, de cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires (*DiBattista et al. 1991; Amano et al. 1993; Masferrer et al. 1994; Masferrer and Seibert 1994; Masferrer et al. 1994; Trotter 1996*). Leurs effets bénéfiques sont cependant controversés. Certains GC, à des doses définies, inhibent l'expression génique d'inhibiteurs enzymatiques d'importance (TIMP) ainsi que celles de composants matriciels essentiels (*Borden and Heller 1997; Richardson and Dodge 2000; Richardson and Dodge 2003*). Il se pourrait donc qu'ils favorisent aussi la dégradation et la destruction du cartilage articulaire.

Deux GC sont couramment utilisés par injection intra-articulaire chez le cheval, dans le traitement des maladies articulaires inflammatoires dégénératives : l'acétate de méthylprednisolone et l'acétonide de triamcinolone.

I.3.1. Pharmacologie des glucocorticoïdes

I.3.1.1. Structure

Les GC sont des molécules à 21 atomes de carbone organisés en 3 cycles de 6 atomes de carbone et 1 cycle de 5 atomes de carbone. L'activité glucocorticoïde dépend principalement de la présence d'un groupement hydroxyle sur le carbone 11, de la présence de groupements cétone sur le carbone 3 et le carbone 20, et d'une liaison insaturée entre les carbones 4 et 5 (*Trotter 1996*), que possèdent triamcinolone et méthylprednisolone.

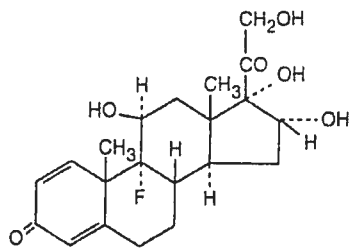


Figure 8 : Molécule de triamcinolone

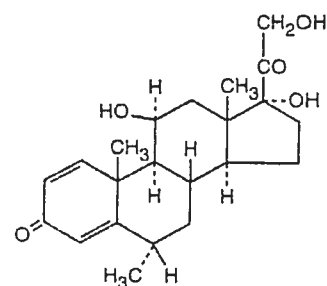


Figure 9 : Molécule de méthylprednisolone

I.3.1.2. Biodisponibilité

Les GC sont disponibles commercialement sous forme estérifiée inactive. La méthylprednisolone se présente sous forme d'acétate (*Boumpas and Wilder*), la triamcinolone sous forme d'acétonide ou d'hexacétonide. Les GC sous ces formes sont peu hydrosolubles, hydrolysés lentement, de moyenne à longue durée d'action. Leur activité et leur durée d'action sont fonction du taux d'hydrolyse de leur forme estérifiée *in situ*.

TA et MPA sont surtout utilisés localement (*Baxter 2000*).

Chez le cheval, le MPA est hydrolysé rapidement dans le liquide synovial, la méthylprednisolone devenant détectable dans le liquide synovial deux heures seulement après l'injection IA de MPA. Le MPA demeure détectable de 2 à 6 jours post-injection dans le liquide synovial, mais est indétectable dans le sang. La méthylprednisolone est décelable dans le sang pendant les 24 heures post-injection synoviale, et de 5 à 39 jours dans le liquide synovial (*Autefage et al. 1986*). La résorption systémique de la méthylprednisolone n'est pas suffisante pour abolir une réponse adrénergique à une stimulation à la corticotropine, mais, elle s'accompagne d'une diminution de la cortisolémie pendant 3 à 4 jours (*Autefage et al. 1986*).

Le TA, comme le MPA (*Autefage et al. 1986*), est hydrolysé rapidement dans le liquide synovial. La triamcinolone est décelable dans le sang 1 heure seulement après l'injection IA de TA. Sa concentration sérique atteint un pic 24 heures post-injection synoviale et demeure au-dessus des seuils de détectabilité pendant 48 heures. Elle s'accompagne d'une diminution de la cortisolémie. Au niveau synovial, la triamcinolone demeure au dessus du seuil de détectabilité pendant 14 jours post-injection (*Chen et al. 1992*).

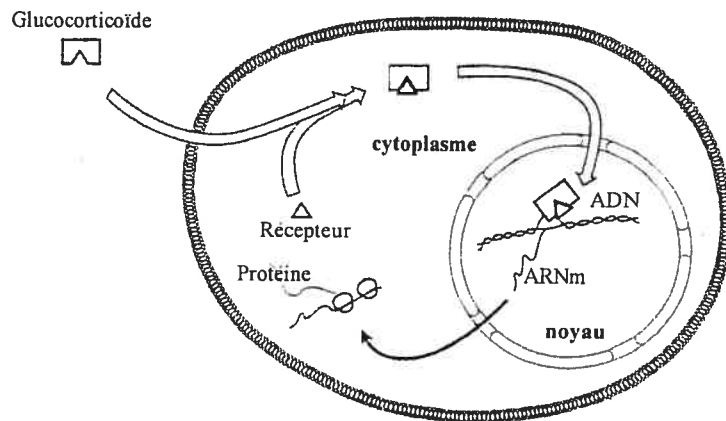
I.3.1.3. Mode d'action

Les GC exercent leurs effets en modulant l'expression de certains gènes via des récepteurs cytoplasmiques spécifiques (*Boumpas and Wilder 2001*). Ils circulent dans l'organisme, que ce soit dans le sang ou le liquide synovial, sous forme libre et sous forme liée aux globulines. La forme libre diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires

des cellules cibles et lie des récepteurs cytoplasmiques spécifiques (*Oakley et al. 1999; Belvisi et al. 2001*). Il existe deux isoformes très homologues de ces récepteurs chez l'Homme appelés récepteurs GR α et GR β (*Bamberger et al. 1995; Oakley et al. 1999; Newton 2000; Belvisi et al. 2001*). Ces deux isoformes, présents conjointement dans le cytoplasme de nombreuses cellules (*Sousa et al. 2000*), ne diffèrent que par leur carbone terminal (*Belvisi et al. 2001*).

Le récepteur GR α peut être considéré un facteur de transcription génomique que la liaison aux GC active (*Bamberger et al. 1995*), par changement de conformation alostérique (*Oakley et al. 1999*). Le complexe GC-GR α formé au niveau cytoplasmique diffuse vers le noyau où il va alors réguler l'expression de certains gènes.

Figure 10 : Mode d'action simplifié des glucocorticoïdes au niveau cellulaire – selon Trotter 1996



Cette régulation se fait selon divers procédés (transcription génique, répression génique, répression de facteurs de transcription génique) (*Beato et al. 1995; Oakley et al. 1999; Belvisi et al. 2001; Webster et al. 2001; Chikanza 2002; Saklatvala 2002*).

Le récepteur GR β , lequel réside plus dans le noyau des cellules que dans leur cytoplasme, et ce indépendamment de la présence ou non de GC, est incapable de lier les GC et donc de directement activer ou réprimer l'expression génique (*Bamberger et al. 1995; Oakley et al. 1999*). En présence de GC, le récepteur GR β agit comme un inhibiteur sélectif dose-dépendant de l'activité du complexe GC-GR α sans affecter l'affinité du GC pour le récepteur GR α (*Hecht et al. 1997; Oakley et al. 1999*).

Peu de choses sont actuellement connues sur les teneurs endogènes relatives de ces deux isoformes (*Oakley et al. 1999; Gagliardo et al. 2001*). De nombreuses études

rapportent cependant qu'il existe une forte corrélation entre l'augmentation de l'expression de l'isoforme GR β , qui est inductible par les cytokines, et le développement d'une moindre réponse et d'une résistance aux GC (*Oakley et al. 1999; Sousa et al. 2000; Webster et al. 2001; Chikanza 2002; Orii et al. 2002*).

I.3.2. Effets des glucocorticoïdes sur les articulations

TA et MPA sont des GC synthétiques, des molécules possédant donc une activité anti-inflammatoire accrue et une activité minéralo-corticoïde atténuée (*Baxter 2000*).

I.3.2.1. Effets anti-inflammatoires (se reporter au chapitre I.2.4.1.2.)

I.3.2.2. Effets sur les principales structures articulaires

I.3.2.2.1. Effets sur la membrane synoviale

Les effets de plusieurs GC sur la membrane synoviale ont été étudiés dans diverses espèces et sur divers modèles expérimentaux de synovites (se reporter au Tableau II).

L'homogénéité n'étant pas de mise parmi les études rapportées (espèces différentes, modèles expérimentaux différents, GC utilisés différents), en tirer des conclusions s'avère discutable. La plupart des auteurs s'entendent cependant sur un effet anti-inflammatoire des GC au niveau de la membrane synoviale et un effet positif des GC sur la synthèse d'HA par les synoviocytes (*Tulamo 1991; Pitsillides et al. 1994; Frisbie et al. 1997*). L'HA semble réguler favorablement la production de prostaglandines, en particulier la PGE₂, principale PG impliquée dans la médiation de la douleur (*Yasui et al. 1992; Frean and Lees 2000*).

Tableau II : Principales études ayant porté sur les synovites ou les changements observés au niveau de la membrane synoviale lors de traitement IA par des GC

Espèce	Modèle	Glucocorticoïde	Effets observés en rapport avec la membrane synoviale	Auteur
Cheval	In vivo Fragmentation ostéochondrale	TA 12 mg IA	Infiltration moindre par les cellules inflammatoires Moindre hyperplasie de l'intima Moindre fibrose de l'intima	(Frisbie et al. 1997)
Cheval	In vivo Fragmentation ostéochondrale	MPA 100 mg IA	Moindre hyperplasie de l'intima Moindre vascularisation de la membrane synoviale	(Frisbie et al. 1998)
Cheval	In vitro Explants de cartilage Synovite à LPS	MPA (0.1 mg/kg)	Effets du LPS : augmentation des ARNm des composants matriciels (COLII, PG) Effets MPA : diminution des ARNm des composants matriciels (COLII, PG)	(MacLeod et al. 1998)
Cheval	In vivo Synovite à LPS	MPA	Effets LPS : prolifération de la membrane synoviale, absence de modification de la synthèse de PG, augmentation de la synthèse de PT Effet MPA : diminution de la synthèse de PG, augmentation de la synthèse de PT	(Todhunter et al. 1998)
Cheval Chien	In vitro Explants de cartilage Synovite à MCM	MPS (0.001 à 10 mg/ml)	Effets MCM : diminution de la synthèse des PG Effets MPS : maintien de la synthèse des PG	(Murphy et al. 2000)
Homme	In vivo Réculte de membrane synoviale de patients atteints ou non d'OA, traités ou non avec un GC	MPA	OA non traitée : présence de CD68, MCP-1, MIP-1, MMP-1, MMP-3, TIMP1, TIMP2. OA traitée avec MPA : légère réduction de l'infiltration macrophagique (CD68), le reste est inchangé	(Young et al. 2001)

I.3.2.2.2. Effets sur le cartilage articulaire

Beaucoup d'études ont été faites pour percer les effets des GC sur le cartilage articulaire et les maladies qui l'affectent afin de statuer sur leur efficacité, leur innocuité, leur nocivité. Des effets favorables comme défavorables ont été rapportés.

L'interprétation de l'ensemble des résultats rapportés est difficile à cause du manque d'homogénéité de toutes les études menées :

- toutes les espèces ou presque ont été utilisées comme cobayes :
cheval (*Chunekamrai et al. 1989; Frisbie et al. 1997; Frisbie et al. 1998*), chien (*Pelletier et al. 1994; Pelletier et al. 1995; Murphy et al. 2000*), homme (*Young et al. 2001*), lapin (*Stricker et al. 1996*), porc vietnamien (*Williams and Brandt 1985*), poule (embryon) (*Oikarinen et al. 1988*), souris (*Verschure et al. 1994; Nakazawa et al. 2002*),
- certaines études, au sein d'une même espèce (par exemple le cheval), ont été menées *in vitro* (*Dechant et al. 2003*), d'autres *in vivo* (*Foland et al. 1994; Frisbie et al. 1997; Frisbie et al. 1998*)
- certaines études ont été faites (par exemple chez le cheval) sur des modèles expérimentaux d'inflammation ou de déstabilisation articulaire (*Kawcak et al. 1998*), d'autres sur des individus sains (*Fubini et al. 2001*),
- certaines études ont analysé directement la composition du cartilage et les variations de celle-ci (*Chunekamrai et al. 1989*), d'autres celles du milieu de culture ou media (*Dechant et al. 2003*), d'autres celles du liquide synovial (*Robion et al. 2001*), d'autres les modifications des propriétés biomécaniques du cartilage (*Murray et al. 1998*),
- tous les GC, qu'ils soient ou non d'un même groupe, d'une même forme estérifiée, ont été testés à des posologies diverses et variées.

Nous allons nous concentrer sur les données actuellement disponibles chez le cheval .

I.3.2.2.2.1. Effets macroscopiques et histologiques (se reporter au tableau III)

I.3.2.2.2.2. Effets sur les composants matriciels et leur métabolisme (se reporter au tableau IV)

Toutes ces études ne permettent pas de statuer de façon tranchée sur les effets des GC sur le cartilage, que ces effets soient macroscopiques, microscopiques ou métaboliques. Des tendances semblent cependant se dessiner :

- tous les GC semblent avoir un effet néfaste sur le cartilage, que cet effet soit macroscopique, microscopique ou métabolique, aux doses actuellement recommandées (MPA 60 à 120 mg; TA 12 mg).
- les effets des GC sur l'inflammation et les différentes structures articulaires sont molécule-dépendants, dose-dépendants, temps-dépendants (*Richardson and Dodge 2003*).

I.3.3. Effets systémiques des glucocorticoïdes injectés intra-articulaires

La diffusion systémique des GC suite à leur injection intra-articulaire et leurs effets sur la cortisolémie ont été démontrés (*Autefage et al. 1986 ; Chen et al. 1992*). Les effets des GC circulants sur le cartilage d'articulations distantes suite à leur injection intra-articulaire n'ont cependant été que peu étudiés (*Lillich et al. 1996*). Seules deux études ont rapporté, à ce jour, chez le cheval, des effets réels constatés dans plusieurs articulations de GC injectés dans une seule. Ainsi, le MPA, injecté à la dose de 60 mg, affecte le métabolisme du COLII, pas celui des PGA, dans l'articulation contro-latérale à celle traitée (*Robion et al.*). Le TA, quant à lui, lorsqu'injecté à la dose de 12 mg, induit une diminution de la concentration en GAG dans le cartilage de l'articulation controlatérale. Aucune étude à ce jour n'a démontré s'il s'agissait d'effets systémiques avec répercussion articulaire ou d'effets articulaires à distance !

Le but de notre étude était d'étudier, par l'analyse séquentielle de biomarqueurs du métabolisme du cartilage libérés dans le liquide synovial (une technologie récente en laquelle de grandes attentes sont placées) les effets IA d'injections répétées (étude longitudinale) de TA sur le métabolisme du cartilage articulaire des articulations traitées et des articulations contrôles (effet systémique).

Tableau III : Principales études ayant montré des changements macroscopiques cartilagineux lors de traitement IA à base de GC chez le Cheval

Modèle	Glucocorticoïde	Effets macroscopiques observés du GC étudié sur le cartilage	Auteur
In vivo Animal Sain	MPA 120mg (IA répétées)	Augmentation de la teneur en eau Perte de basophilie Perte de la coloration au Safranin O Nécrose des chondrocytes Hypocellularité cartilagineuse	(Chunekamrai et al. 1989)
In vivo Défaut ostéochondral induit	MPA 100 mg (IA répétées)	0% du défaut resurfacé avec du fibrocartilage (contre 48.6% dans l'articulation contrôlée) Changements morphologiques significatifs : - formation de cluster de chondrocytes, - défaut d'architecture en palissade, - nécrose cellulaire.	(Shoemaker et al. 1992)
In vivo Fragmentation ostéochondrale Exercice	BET 15 mg (IA répétées)	Aucun effet macroscopique significatif Tendance à plus de lésions histologiques (non significatif)	(Foland et al. 1994)
In vivo Animal sain	MPA 100 mg (IA répétées)	Aucun changement radiographique Diminution de la coloration au safranin-O Diminution du contenu en acide uronique Augmentation de la concentration en hydroproline	(Trotter 1996)
In vivo Fragmentation ostéochondrale Exercice	TA 12 mg (IA répétées)	Meilleurs paramètres histo-morphologiques	(Frisbie et al. 1997)
In vivo Fragmentation ostéochondrale Exercice	MPA 100 mg (IA répétées)	Plus fortes érosions cartilagineuses et lésions morphologiques	(Frisbie et al. 1998)
In vivo Animal sain Exercice	MPA 120 mg (IA répétées)	Altération des propriétés biomécaniques du cartilage (épaisseur, résistance à la pression)	(Murray et al. 1998)

Tableau IV : Principales études ayant montré des changements au niveau des teneurs en composants matriciels lors de traitement IA à base de GC chez le Cheval

Modèle	Glucocorticoïde Partie analysée	Effets observés du GC étudié sur les composants matriciels	Auteur
In vivo Animal sain	MPA Cartilage	Diminution du contenu en PG Diminution de la synthèse des PG Diminution de la synthèse de COLII	(Chunekamrai et al. 1989)
In vivo Animal sain	MPA Liquide synovial	Augmentation de la relâche de PGA	(Saari et al. 1992)
In vivo Animal sain	MPA Cartilage	Diminution du contenu en GAG	(Fubini et al. 1993)
In vitro Explants de cartilage Animal sain	MPA Media Cartilage	Suppression de la synthèse des PG Diminution de la perte de PG	(Jolly et al. 1995)
In vitro Explants de cartilage Animal sain	MPA Media	MPA faible dose : - Augmentation de la synthèse protéique totale - Augmentation de la synthèse de COLII - Pas d'effet sur la synthèse et la dégradation des PG MPA forte dose : - Diminution de la synthèse des PG, - Diminution de la synthèse de COLII - Diminution de la dégradation des PG - Diminution de la dégradation des nouveaux PG synthétisés	(Todhunter et al. 1996)
In vitro Explants de cartilage Stimulation avec IL-1	TA Media Cartilage	TA : - Diminution de la synthèse et de la concentration en PG TA et IGF-1 : - Préservation des PG - Augmentation du contenu en COLII	Frisbie 1997
In Vitro Explants de cartilage Modèle synovite LPS	MPA Media	LPS : Augmentation en ARNm du proCOLII et des PGA MPA : Diminution de l'ARNm du proCOLII LPS et MPA : idem LPS seul	(MacLeod et al. 1998)

Tableau IV : Principales études ayant montré des changements au niveau des teneurs en composants matriciels lors de traitement IA à base de GC chez le Cheval (suite)

Modèle	Glucocorticoïde Partie analysée	Effets observés du GC étudié sur les composants matriciels	Auteur
In vivo Modèle synovite LPS	MPA Media Cartilage	LPS seul : pas de modification de la synthèse de PG MPA seul : - Diminution de la synthèse de PG - Augmentation de la synthèse globale de protéine et de COLII	(Tothunter et al. 1998)
In vitro Explants de cartilage Modèle synovite MCM	MPS	MCM : Diminution de la synthèse des PG MPS : Diminution de la synthèse des PG (dose dépendant) MCM et MPS : Synthèse des PG préservée	(Murphy et al. 2000)
In vitro Explants de cartilage Chondrocytes Animal sain	MPA Media	Diminution en ARNm du proCOLII Diminution de la synthèse totale du collagène	(Fubini et al. 2001)
In vivo Animal sain	MPA Liquide synovial	Articulation MPA- Augmentation significative de KS et 846 - Diminution significative de CPII Articulation contrôle : - Diminution significative de CP II	(Robion et al. 2001)
In vitro Explants de cartilage Stimulation IL-1	MPA ou TA Media	Diminution de la synthèse en GAG Augmentation de la dégradation de GAG Augmentation de la concentration en GAG dans le media	(Dechant et al. 2003)
In vitro Chondrocytes Stimulation IL-1 et TNF α	DEX, PRED, TA à différentes concentrations Media	Diminution des ARNm de MMP1, MMP3, MMP13 et TIMP1 (TA et DEX semblent plus efficaces que PRED) Diminution des ARNm de COLII et PGA	(Richardson and Dodge 2003)
In vitro Explants de cartilage Stimulation IL-1	TA Media	TA + IGF-1: - Augmentation de la relâche de PGA (GAG surtout) - Augmentation de la synthèse de GAG	(Sandler et al. 2004)

Chapitre II : Article

Article :

Céleste, C., Ionescu, M., Poole, A.R., and Lavery, S. (2005) Repeated intraarticular injections of tramcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism as measured by biomarkers in synovial fluid. *Journal of Orthopaedic Research*, **23** : 602-610.

Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism as measured by biomarkers in synovial fluid.

Christophe Céleste ^a, Mirela Ionescu ^b, A.Robin Poole ^b, Sheila Laverty ^{a,*}

^a Département des Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6

^b Joint Diseases Laboratory, Shriners Hospitals for Children, Departments of Surgery and Medicine, McGill University, Montreal, Quebec H3G 1A6

* Corresponding author:

Sheila Laverty, MVB, MRCVS, Dipl. ACVS, Dipl. ECVS

Département des Sciences Cliniques,

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal ,

C.P. 5000

St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6

████████████████████

████████████████████

██

II.1. Summary

Although intraarticular (IA) corticosteroids are frequently used to treat joint disease, the effects of their repeated use on articular cartilage remains controversial. The aim of our study was to determine the effects of a clinically recommended dose of IA triamcinolone acetate (TA), on synovial fluid (SF) biomarkers of cartilage metabolism. Ten adult horses, free of osteoarthritis (OA) in their radiocarpal joints, were studied. One radiocarpal joint of each horse was randomly chosen for treatment and the contralateral anatomically paired joint acted as the control. Aseptic arthrocentesis was performed weekly on both joints for 13 weeks. The initial results from the first 3 weeks of the experimental period established baseline untreated control marker levels for each joint, each being its own control. On weeks 3, 5, and 7, a sterile suspension of 12 mg of TA was injected into the treated joint and an equivalent volume of sterile saline solution (0.9%) was injected into the control joint. SF was immunoassayed for biomarkers of aggrecan turnover (CS 846 & KS), types I and II collagen cleavage (C1,2C) and type II collagen synthesis (CPII). In treated joints, there was a significant increase in CS 846, KS, C1,2C and CPII epitope concentrations following IA TA injections when compared to baseline levels. There was also a significant increase in C1,2C and CP II epitope concentrations in the contralateral control joints following IA TA injections in the treated joint. Significant differences were observed between treated and control joints for all markers except CPII. These findings indicate that TA alters articular cartilage and collagen metabolism in treated and, interestingly, also in control joints, suggesting a systemic effect of the drug. Though intuitively the observed findings would favour the hypothesis that long term IA TA treatment changes joint metabolism and this may have detrimental effects; further studies would be necessary to confirm this.

Running title: Triamcinolone affects cartilage metabolism *in vivo*

Key words: cartilage, biomarkers, corticosteroids, triamcinolone, horse, proteoglycan aggrecan, collagen.

II.2. Introduction

For several decades IA corticosteroid injections have been used in horses and humans to successfully palliate pain and inflammation associated with OA. Controversy has long existed concerning the effects of local corticosteroid therapy on articular cartilage metabolism. There is a persistent concern that these injections, when used repeatedly as long-term treatment, may promote cartilage degradation and destruction.

Both favorable and detrimental effects have been demonstrated. Direct or indirect evidence for reduced articular cartilage matrix synthesis and or proteoglycan degradation have been provided both by *in vitro* (Jolly et al. 1995; MacLeod et al. 1996; Todhunter et al. 1996; Dahlberg et al. 2000; Murphy et al. 2000; Dechant et al. 2003; Sandler et al. 2004) and *in vivo* studies (Chunekamrai et al. 1989; Trotter et al. 1991; Shoemaker et al. 1992; Fubini et al. 1993; Frisbie et al. 1998; Todhunter et al. 1998; Young et al. 2001). However, a chondroprotective role has been reported in animal models of OA (Williams et al. 1985; Pelletier et al. 1989). Recent data from a long term prospective study in humans has illustrated no significant deleterious effects on follow up radiographic evaluation following repeated IA TA (40 mg) injections over a 2 year period (Raynault et al. 2003). Radiographic assessment of joint space narrowing has methodological flaws and may not accurately detect degenerative changes in the articular cartilage (Altman 2004).

Articular cartilage is composed of chondrocytes embedded in a matrix of principally type II collagen (COLII) and proteoglycan aggrecan (PGA) molecules, which they synthesize and degrade (Poole 2001; Poole et al. 2001). The release of degraded aggrecan molecules containing keratan sulfate (KS) or chondroitin sulfate (CS) 846 epitopes from the matrix into SF are detectable by immunoassay and reflective of aggrecan turnover (Todhunter et al. 1993; Rizkalla et al. 1992; Fubini et al. 1993; Fawthrop et al. 1997; Frisbie et al. 1999; Laverty et al. 2000; Thonar et al. 2001). The release of the CS 846 epitope (846), present in juvenile but almost absent from adult articular cartilage, is closely correlated with aggrecan synthesis (Poole et al. 1994). Adult articular cartilage is rich in KS epitope and its release into synovial fluid (SF) is predominantly correlated with aggrecan degradation (Rizkalla et al. 1992; Todhunter et al. 1993; Poole et al. 1994; Laverty et al. 2000).

COLII is the principal collagen of articular cartilage. Before newly synthesized type II procollagen molecules are incorporated into collagen fibrils, the carboxy-propeptide (CPII) is released by proteinases into SF (Poole 2001; Poole et al. 2001). The content of CPII released is directly related to the synthesis of COLII in normal and OA cartilage (Nelson et al. 1998). The degradation of mature COLII fibrils is collagenase dependant. The product of the primary initiating event in this cleavage may be measured in body fluids by immunoassay of a C1,2C neopeptide which is created and liberated by the enzymatic degradation process (Billinghurst et al. 1997; Poole et al. 2003). This assay detects not only the cleavage of COLII but also that of type I collagen (COLI), present in synovium, joint capsule and ligaments, in view of sequence homology (Billinghurst et al. 1997). Cartilage levels of C1,2C increase with OA (Billinghurst et al. 1997) and its release from cartilage is increased (Dahlberg et al. 2000). The contemporaneous analysis of body fluids using these complementary assays now allow tracking of both synthesis and degradation of articular cartilage and joint soft tissue degradation in synovial fluid *in vivo* .

We have previously used some of these assays in equine SF to follow longitudinally *in vivo* the metabolic effects of repeated IA injections of methylprednisolone acetate (MPA) on articular cartilage and observed a reduction in COLII synthesis and elevated aggrecan turnover in the treated joints (Robion et al. 2001).

We hypothesize that all currently used corticosteroids have similar measurable metabolic effects on articular cartilage *in vivo*. The purpose of this study was to determine the effects of repeated IA injections of another frequently used corticosteroid, TA, on equine articular cartilage by measurement of SF biomarkers of cartilage metabolism. We present data which suggest that TA also alters cartilage metabolism, detectable by biomarkers, when injected IA providing additional support for our previous study (Robion et al. 2001). Unlike our previous work, however, we obtained evidence for an increase in collagen synthesis with TA in both the treated and control joints over time. Surprisingly, and of concern, we observed a slowly progressive increase in degradation of type I/II collagens in treated and control joints with corticosteroid therapy.

The combined results of these 2 studies demonstrate that the measurement of biomarkers longitudinally allows tracking of articular cartilage metabolic response to IA

medication *in vivo*. This consistent finding may prove useful for drug development in the field of OA.

II.3. Methods

II.3.1. Animals

Ten adult horses (7 females and 3 castrated males) with a mean age of 12 years (range 6 – 24 years old) and a mean weight of 492 kg (range 426 – 612 kg) were studied.

All horses had a thorough physical, lameness and radiographic examination of their radiocarpal joints before entry into the study. The radiographic examination included 5 views (dorsopalmar, lateromedial, dorsopalmar lateromedial oblique, dorsopalmar mediolateral oblique, and flexed lateromedial projections). All horses included in the study were free of both clinical and radiographic evidence of joint disease and had no history of injury, neither relevant disease nor IA therapy.

Horses were stabled on treatment days and were allowed free exercise in a small paddock on non treatment days. The Animal Care and Use Committee of the Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal approved the experimental design.

One radiocarpal joint of each horse was randomly chosen for treatment. The contralateral anatomically paired joint was used as a control. Aseptic arthrocentesis was performed weekly (weeks 1 to 13) on both joints. Immediately prior to each arthrocentesis, each joint received an IA injection of 2 ml of a sterile 0.04% phenol red solution followed by ten flexion-extensions of the joint to ensure mixing with synovial fluid to permit estimation of the SF volume by dilution of phenol red (Robion et al. 2001). SF samples were collected in both dry and EDTA tubes. Biomarker levels from weeks 1 to 3 were considered baseline untreated control levels, each joint being its own control before treatment or placebo (Figure 1). On weeks 3, 5 and 7, 1.2 ml of a sterile aqueous suspension of 12 mg of TA (Kenalog 10mg/ml, Sabex, Boucherville, Quebec) (an ester of triamcinolone) was injected into the treated joint and a 1.2 ml of a sterile saline solution 0.9% was injected into the control contralateral joint. The IA injections were performed immediately following withdrawal of the SF sample as in our previous study (Robion et al. 2001) (Figure 1).

Varying doses and injection intervals have been proposed for intraarticular corticosteroid therapy, of human (Bird 1998; Neudstadt 2001; Jones and Doherty 2003) and equine (Trotter 1996) joints. This lower dose was selected to determine if even lower doses, which some propose to be less toxic, had detectable metabolic effects.

II.3.2. Clinical examination

Clinical examination of the joints was performed twice weekly throughout the study and involved a manual palpation of both radiocarpal joints in both the standing and flexed position for evidence of heat, pain, synovial effusion or bony proliferation at the joint margins and a lameness evaluation with flexion tests if required.

II.3.3. Synovial fluid examination

The SF EDTA samples were analyzed within 6 hours of arthrocentesis. SF analysis included total nucleated cell count (Cell-Dyn 3500; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), differential cell count and a total protein concentration (Refractometer, Leica TS Meter, Reichert-Jung, Model 10400A).

II.3.4. Synovial fluid volume

The SF samples in dry tubes were centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes at room temperature. The optical density was measured and the joint fluid volume calculated as described previously (Robion et al. 2001). Briefly, prior to freezing, 50 μ l of the SF sample containing phenol red and the standard injected phenol red solution were each diluted in 1.5 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 8.4). The optical density of these two solutions was measured spectrophotometrically at 560 nm. The joint fluid volume was calculated from the equation $((\text{Optical density phenol red in standard solution} / \text{Optical density phenol red in joint fluid}) \times 2) - 2 = \text{original joint fluid volume}$. The remaining SF sample was frozen at -70°C until analyzed.

II.3.5. Biomarker assays

II.3.5.1. Aggrecan 846 epitope

Total aggrecan 846 epitope was assayed as described (Robion et al. 2001) using a solution-phase competitive radioimmunoassay employing the mouse monoclonal IgM 846 antibody. Briefly, the assay was performed using ^{125}I -radiolabeled human fetal aggrecan as a tracer, and the same but unlabeled purified human fetal aggrecan as the standard (Poole et al. 1994; Poole 2001). The immune complex so formed was removed by precipitation, first

with a rabbit anti-mouse IgM serum, then with a pig anti-rabbit IgG serum. The results were expressed as μg equivalents of fetal human aggrecan.

II.3.5.2. KS epitope

An ELISA assay was used, employing a mouse monoclonal IgG1 antibody AN9P1. Briefly 50 μl of the SF sample or standard human adult aggrecan were each mixed with 50 μl AN9P1 monoclonal antibody at a dilution in PBS-1% BSA-Tween 20 (pH 7.2) previously determined by checkerboard analysis. They were incubated for 1 hour at 37 °C then were transferred to a plate coated with chondroitinase ABC digest adult aggrecan (10 ng/ml) and incubated 45 min at 4°C. After washing, 50 μl alkaline phosphatase-goat anti-mouse IgG conjugated, diluted 1:1000 in PBS-1% BSA-Tween 20 (pH 7.2) were added to each well and the plates were incubated for 1 hour at 37°C. Finally, 50 μl of Sigma 104 substrate was added and the optical density (OD) was measured spectrophotometrically at 405 nm. The results are expressed as μg equivalents of adult human aggrecan.

II.3.5.3. CP II epitope

The C-propeptide of COLII was assayed as described (Robion et al. 2001) by radioimmunoassay of ^{125}I labeled bovine C-propeptide radiolabeled using the chloramine-T method. Briefly a rabbit antiserum (R 160) to bovine CPII was used as the first antibody. The assay employed a second step pig anti-rabbit IgG as a second antibody. The results are expressed as μg equivalent of bovine fetal CPII.

II.3.5.4. C1,2C epitope

The peptide $\text{CGPP}_{(\text{OH})}\text{GPQG}$ (C1,2C), representing the neoepitope generated by collagenase, was conjugated to ovalbumin and a polyclonal antibody was prepared as described. The antibody was purified by Protein A affinity chromatography and biotin-labeled using sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce). Sulfo-NHS-LC-Biotin was dissolved in distilled water at a 1mg/ml concentration and mixed with the purified antibody, previously dialysed against 0.1M carbonate buffer pH 8.5, at a ratio of 80 μg Biotin per mg antibody. The Biotin-antibody mixture was incubated for 1 hour at room temperature, with stirring, followed by the removal of free Sulfo-NHS-LC-Biotin by dialysis in PBS pH 7.2, without

sodium azide. For the quantitative analysis of C1,2C fragments we used a DELFIA time-resolved immunofluorometric ELISA assay, which greatly reduces the background fluorescence signal. To improve the sensitivity of the immunoassay, the C2C peptide (CGGEGPP_(OH)GPQG) was conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH), using bromoacetic acid-N-hydroxysuccinimide ester (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). White opaque 96-well plates (Greiner) were coated with C2C peptide-KLH conjugate diluted in PBS pH 7.2 (100 ng/ml, 50 µl/well). After an overnight incubation at 4°C, the plates were washed six times with an automatic plate-washer and blocked with 150 µl/well PBS pH 7.2 containing 1 % wt/vol bovine serum albumin (BSA), radioimmunoassay grade. Standards were prepared by diluting a 1 mg/ml stock solution of C1,2C peptide to 10, 3.33, 1.11, 0.37, 0.12, 0.041 and 0.014 µg/ml in PBS-1% BSA. Standards and samples were added at 50 µl/well, in triplicate, to 96 well U-bottom polypropylene plates (Corning Life Sciences), used as preincubation plates, followed by the addition of 50 µl/well of C1,2C biotinylated antibody, at a dilution in PBS-1 % BSA-0.1% Tween 20 (pH 7.2) previously determined by checkerboard analysis. The triplicate nonspecific binding wells consisted of 50 µl PBS-1 % BSA and 50 µl PBS-1 % BSA-0.1 % Tween 20, and the triplicate maximum binding wells contained 50 µl PBS-1 % BSA and 50 µl of the C1,2C biotinylated antibody. After an overnight incubation at 4°C, using a multichannel pipette, 50 µl of each preincubated well was transferred to the equivalent well of a Greiner white ELISA plate, coated with C2C peptide-KLH. The ELISA plates were each incubated, with shaking, for 45 minutes at 4°C and then washed three times with PBS-0.1% Tween 20. DELFIA Eu-labeled streptavidin (EG&G WALLAC), diluted 1:1000 in DELFIA assay buffer (EG&G WALLAC), was added to each plate at 50 µl/well and incubated for 1h at 37°C. The plates were subsequently washed three times with PBS-0.1% Tween 20 and once distilled water. Next, 50 µl/well of DELFIA enhancement solution (EG&G WALLAC) were added and the plates were incubated with shaking at room temperature for 30 minutes. Eu-labeled streptavidin is practically non-fluorescent, but when Eu³⁺ is dissociated from the conjugate by the acidic chelating detergent DELFIA enhancement solution it rapidly forms a new highly fluorescent chelate. Fluorescence at 615 nm was measured by a EG&G WALLAC 1412 plate reader (Turku, Finland). Calibration curve-fitting and interpolation to determine unknown analyte concentrations were performed by the instrument software.

Although these assays employ human standards, it was previously shown in other studies of equine body fluids (Lavert et al. 2000; Robion et al. 2001) and cartilage (Lavery et al. 2002) that these immunoassays can be used to study equine samples.

The intra-assay and inter-assay coefficients of variation for the evaluation of these synovial fluid biomarkers of cartilage metabolism were all < 5% or < 13%, respectively (Matyas et al. 2004).

Synovial volume adjustment

The total amounts of KS, CS 846, CPII and C1,2C per joint were determined by multiplying concentration per ml by the total volume of SF per joint.

II.3.6. Statistical analysis

SF volume, KS, CS 846, C1,2C and CPII per joint were expressed as mean (\pm SD) values. Data were log transformed and a one way ANOVA repeated-measures general linear model with two cross-over factors, time and treatment, was performed between all the weeks on control and treatment joints. A p value of <0.05 was considered significant. When changes were significant, post-hoc Wilcoxon signed-rank tests were performed between control and treatment joints. Analyses were performed on both pre and post synovial volume adjustment data. All samples, at all time points and in all animals, throughout the experimental period were included in this analysis. A Pearson correlation test was also performed to evaluate correlations between KS, CS 846, CPII and C1,2C.

II.4. Results

II.4.1. Clinical examination

The treatment did not cause joint effusion or altered gait during the experimental period.

II.4.2. Synovial fluid analyses

The SF total nucleated cell counts remained within normal ranges ($< 1 \times 10^6/\text{ml}$) throughout the experimental period; with a mean \pm S.D. of $0.3 \pm 0.2 \times 10^6/\text{ml}$ in the control joints and $0.4 \pm 0.4 \times 10^6/\text{ml}$ in the treated joints. Similarly the total protein concentrations also remained within normal ranges (5 to 25 mg/ml); with a mean \pm S.D. of 12.8 ± 3.7 mg/ml and 14.5 ± 4.5 mg/ml in the control and treated joints respectively. These results indicate that the repeated joint manipulations did not elicit detectable joint inflammation in these animals throughout the study.

II.4.3. Synovial fluid volume

The mean (\pm S.D.) SF volumes were 10.0 ± 2.51 ml and 9.7 ± 3.3 ml in the control and treatment joints respectively and there were no significant differences in volume on ANOVA analysis between baseline untreated control and treatment periods or between the controlateral control and treated joints. (Figure 2A)

II.4.4. Aggrecan 846 epitope

The baseline untreated control values of the 846 epitope (weeks 1-3) remained stable. No significant differences were detected between joints or with time, until the initiation of IA TA injections. Following the IA TA injections (week 3), the 846 epitope content in the treated joints exhibited a significant transient increase (9 fold) after 1 week when compared to baseline untreated control levels ($P < 0.0001$). The overall levels subsequently decreased and progressively returned to reach baseline untreated control levels at week 8, despite the repeated TA injections at weeks 5 and 7 in the treated joints. This was followed by a small but significant decrease of the 846 epitope in the treated joints at week 10 ($P < 0.05$), 3 weeks after the last injection. In the contralateral control joints, the 846 epitope remained at baseline untreated control levels for the majority of the

experiment, despite a small (2 fold) significant rise 1 week following the first TA injection ($P<0.05$).

The ANOVA repeated measures detected a significant effect of treatment ($p=0.003$), and time ($P<0.0001$) with a strong interaction between these parameters ($P<0.0001$) in the treated but not the control joints. Wilcoxon signed-rank analysis of results showed a significant difference between treated and control joints from weeks 4 to 10 with the greatest divergence at weeks 4 and 5 ($P<0.0001$) (Figure 2B).

II.4.5. KS epitope

Similar to the 846 epitope, the baseline untreated control values of the KS epitope (weeks 1-3) remained stable in both joints until the initiation of IA TA injections. Following the IA TA injections (week 3), the KS epitope showed a marked increase at 1 week following the first TA injection (week 3), attaining 6 times the baseline untreated control levels ($P<0.0001$) (Figure 2C). Then, despite repeated TA injection at weeks 5 and 7, it progressively decreased but remained significantly higher than the control joints until week 9 ($P<0.01$). KS values attained baseline untreated control levels at week 11, 4 weeks following the last IA treatment. No significant change in KS levels occurred in the contralateral untreated joints when compared to baseline untreated control levels.

The ANOVA repeated measures detected a significant effect of treatment ($P<0.0001$), and time ($P<0.0001$) with a strong interaction between these parameters ($P<0.0001$) in the treated joints but not in the control joints. Wilcoxon signed-rank analysis indicated that the treated joint had a significantly higher KS concentration than the control joints from weeks 4 to 8 ($p=0.004$).

II.4.6. CP II epitope

As with the other biomarkers, no significant difference in baseline untreated control values of CP II were evident between joints or over time. Values remained stable from week 1 to week 3. There were no significant differences between the treated and contralateral control joints throughout the experiment, since there was a significant and similar increase over baseline untreated control levels in both treated and control joints. This was in contrast to the aggrecan and C1,2C epitopes (Figure 2E). Thus a significant

time effect was detected ($P < 0.0001$), although no treatment effect ($p = 0.65$) or interaction ($p = 0.76$) with ANOVA analysis; CP II levels in both joints significantly increased over time from baseline levels until week 13.

II.4.7. C1,2C epitope

Baseline untreated control levels (weeks 1-3) remained stable over the three week period with no significant differences detected between joints or with time. Similar to the aggrecan epitopes, but to a much lesser degree, the C1,2C in the treated joints showed an increase 1 week following the TA injections at week 3 ($P < 0.001$). Unlike the aggrecan molecules, the levels of C1,2C continued to rise until a maximum was reached at week 8 ($p = 0.0004$), attaining twice the baseline untreated control levels (Figure 2D). The levels subsequently decreased but remained significantly higher than those at baseline untreated control levels until week 12 ($P < 0.0001$). In the control joints, C1,2C also showed an increase but 3 weeks following initiation of TA injections (week 1). This increase was similar to the increase observed in the treated joints but to a lesser degree with a maximum increase at week 8 ($p = 0.0078$). The levels subsequently decreased but remained significantly higher than baseline untreated control levels until week 11 ($p = 0.0069$). This increase in the controlateral joint served to partly mask the effect in the corticosteroid injected joint.

The ANOVA repeated measures test revealed a significant effect of treatment ($p = 0.026$) and time ($P < 0.0001$). The time effect was similar in both treated and saline injected joints ($p = 0.12$). Yet Wilcoxon signed-rank analysis of results showed a significant difference between treated and control joints from weeks 4 to 11 ($P < 0.0001$) (Figure 2D).

II.4.8. Correlation between aggrecan and type II collagen epitopes

It is of interest that there was a significant correlation between the aggrecan epitopes levels in the SF ($P < 0.001$) and also both collagen epitopes ($P < 0.01$) but none of the aggrecan and the collagen epitopes were significantly correlated with each other.

We obtained similar results on statistical analysis of the biomarker levels pre and post-volume adjustment.

II.5. Discussion

We present data showing that IA injections of TA have marked effects on articular cartilage and joint collagen metabolism, predominantly aggrecan but also collagen turnover, detectable by biomarker analysis of SF. These findings confirm and extend our previous observations with another commonly used corticosteroid, MPA (Robion et al. 2001). Both corticosteroids were injected IA at clinically recommended doses and effects were detected at 1 week after injection and persisted in some cases for many weeks after the last injection.

Taken together, these studies suggest that this perturbation of metabolism occurs following most of the currently used IA corticosteroids and raises, once more, questions about the possible safety of their long-term use, despite their evident desirable beneficial palliative effects on OA symptoms. The fact that we have identified metabolic effects following 1 injection of 12 mg of TA suggests that the more commonly used dose of 40 mg in humans could have even more dramatic effects but this was not studied. However there is one caveat; the results we report were obtained in healthy joints (on clinical and radiographic examination) and the effects of corticosteroids in OA joints may be different. It remains possible that early cartilage changes of OA were missed using these methods.

In *in vivo*, *ex vivo* or *in vitro* studies, corticosteroids have been reported to normalize alterations in equine articular cartilage metabolism induced by inflammation, even though when used alone they cause perturbation of GAG metabolism (Trotter et al. 1991; Frisbie et al. 1997; MacLeod et al. 1998; Murphy et al. 2000). However others have observed the converse, that in the presence of an inflammatory stimulus, various corticosteroids exacerbate metabolic changes, in an additive way (Dechant et al. 2003). The apparent discrepancy concerning the effects of corticosteroids on articular cartilage may be, in part, explained by differences in experimental protocols, types of corticosteroids studied, varying dosages and concentrations (Todhunter et al. 1996; Murphy et al. 2000; Fubini et al. 2001; Dechant et al. 2003; Richardson and Dodge 2003), use alone or in combination with other drugs (Sandler et al. 2004), and use of different animal models. In both of our studies (Robion et al. 2001) we chose to use a similar experimental design with doses of corticosteroids that reflect clinical use so that our results and comparisons would be of clinical relevance.

During the first 3 weeks of the study, before the initiation of IA TA injections, despite repetitive IA injections and synovial fluid aspiration, cartilage aggrecan turnover and joint collagen metabolism remained stable (baseline untreated control values with no significant variations). Furthermore as no evidence of inflammation was detected on synovial fluid analysis, we concluded that our interventions were not adversely altering joint homeostasis. Immediately (1 week) following the first IA injection, both aggrecan turnover and collagen catabolism were upregulated in the treated joint, demonstrated by the increased release into SF of KS, 846 and C1,2C epitopes. It should be noted that C1,2C can cross react with an epitope exposed on cleavage of both type I and type II collagen and these results could also reflect changes in the matrix of the soft tissues containing type I collagen in the joint, such as synovium, joint capsule or ligaments. However because of the parallel changes we observed in the specific marker for COLII synthesis (CPII) we believe the levels are due predominantly to cartilage effects. IA TA thus directly or indirectly induces an enhanced loss of resident and/or newly synthesized aggrecan and type I/II collagen molecules. Using biomarkers of proteoglycan GAGs, we (Robion et al. 2001) and others (Saari et al. 1992; Roneus et al. 1993) have previously reported that corticosteroids induced release of proteoglycan into SF.

The collagen degradation, reflected by the increased C1,2C levels in the SF, increased until 1 week after the first IA triamcinolone injection. Interestingly a significant but smaller rise in C1,2C was also observed in the saline injected joints when compared to baseline untreated control levels pointing to a systemic effect of TA on collagen turnover which was not observed in the case of proteoglycans. TA, also, stimulated collagen synthesis (CPII levels) in both the treated and contralateral joints almost to an equal extent. Prior to our initial studies (Robion et al. 2001), the *in vivo* IA effects of corticosteroids on joint collagen metabolism had not been addressed, as the methodology to do so was not available.

Biomarker technology thus provides us with new valuable dynamic insights to what is happening *in vivo*, which may be very different from effects observed *in vitro*, under controlled laboratory conditions. *In vitro* (Oikarinen et al. 1988; Todhunter et al. 1996; Poole et al. 2002) and *in vivo* (Chunekamrai et al. 1989) studies have already identified a generalized inhibitory effect of various corticosteroids on cartilage COLII synthesis

(Oikarinen et al. 1988; Srinivas et al. 1994). High doses of corticosteroids also significantly decreased the expression of COLII by equine chondrocytes (Richardson and Dodge 2003). In contrast, IA MPA was reported to increase hydroxyproline levels and COLII synthesis in normal equine cartilage *in vivo* (Trotter et al. 1991). Collagen synthesis in response to corticosteroid injections seems to be a dose-related effect with lower levels increasing synthesis but higher levels depressing it (Todhunter et al. 1996). In our own studies we found that MPA suppressed cartilage collagen synthesis (Robion et al. 2001) whereas TA stimulated it although this was associated with overall increased collagen cleavage.

The alterations in collagen metabolism observed with IA TA treatment in our study differed from the aggrecan response. The overall response was slower, less marked but persisted longer. That the relative degree of maximum metabolic response to the IA injections was less for collagen metabolism (2 fold) compared to aggrecan metabolism (9 fold) is not surprising, as the turnover of aggrecan is generally considered to be much faster in articular cartilage (Poole 2001). Intuitively, collagen metabolism would not be expected to respond as rapidly or even to a similar degree when compared to aggrecan metabolism.

The actual mechanisms of these joint metabolic responses to IA corticosteroids remain to be elucidated. Type II collagen degradation is mediated by collagenases in disease states, such as MMP 13 (collagenase 3) or MMP 1, which instigate the primary cleavage of fibrillar collagens (Poole et al. 2003). Little is known about type I collagen degradation in the joint. As corticosteroids have been shown to decrease MMP and TIMP gene expression in cartilage of normal and RA joints, but not of OA joints (MMP 1, MMP 3, TIMP 1, TIMP 2) (Young et al. 2001) it is difficult to explain the upregulated degradation of collagen we observed. Following an IA injection of 6 mg of TA into equine joints, the synovial molar concentrations of triamcinolone were approximately 10^{-8} to 10^{-6} M up to 14 days (Chen et al. 1992). This molar concentration corresponds to the range of reported concentrations which decreased MMP1, MMP3, MMP13 and TIMP-1 steady-state mRNA in normal equine articular chondrocytes and also suppressed expression of COLII and aggrecan (Richardson and Dodge 2003). Based on these results the involvement of MMPs in liberating molecules into the SF seems unlikely. We (Robion et al. 2001) and others (Todhunter et al. 1993; Todhunter et al. 1996) have reported that IA MPA induces

the release of a population of small proteoglycans and suggest that they may be more susceptible to proteolysis thus causing increased levels of aggrecan epitopes in the SF.

Despite the initial dramatic rise in release into SF of molecules containing KS and 846 epitopes (detectable at the initial sample time, 1 week after injection) it was interesting to note a reduced effect following the second injection 2 weeks later and an even less pronounced response following the third IA injection. Despite this, significant increases, when compared to baseline levels, persisted for up to 1 week after the last injection. This progressive insensitivity of aggrecan turnover to repeated IA corticosteroid injections could be viewed as favorable for long term therapy. Corticosteroid insensitivity is recognized in the management of inflammatory and autoimmune diseases including pulmonary inflammatory disease (asthma) (Barnes et al. 1995; Hamid et al. 1999; Christodoulou et al. 2000; Sousa et al. 2000; Leung and Bloom 2003) inflammatory bowel disease (Hearing et al. 1999; Honda et al. 2000; Orii et al. 2002) and rheumatoid arthritis (Lane et al. 1996; Chikanza et al. 2002) where this insensitivity is a challenging clinical problem associated with life-threatening disease progression (Leung et al. 1997). The mechanisms for corticosteroid insensitivity remain to be elucidated (Leung and Bloom 2003). Further work would be also required to determine whether TA had any effects on clearance of biomarkers from the extracellular matrix to the joint space or through the synovial membrane and lymphatics.

We studied paired anatomical joints as others have reported that corticosteroids were not detected in the contralateral joint after an IA injection (Lillich et al. 1997). Despite this report, remote-site effects of corticosteroids have been observed on articular cartilage GAG content (Frisbie et al. 1998) and on COLII anabolism (Robion et al. 2001) in contralateral joints, pointing to a systemic effect of the IA injected drugs. This study extends these findings concerning collagen turnover as we have provided evidence for both increased synthesis of cartilage COLII and cleavage of joint type I/II collagen in both the treated and remote untreated joints. The systemic effect on COLII anabolism could be viewed as a favorable effect. The inclusion of an additional group of animals receiving saline injections alone in their joints would have helped clearly establish whether the collagen biomarker changes we detected in the contralateral limb were systemic effects of triamcinolone or due to some unelucidated factor in our experimental design.

The comparison of collagen biomarker values in the treated joints with our baseline untreated control values (weeks 1-3) suggests systemic effect of TA.

Detrimental side effects of IA corticosteroids need to be assessed in the context of their therapeutic benefits such as inflammation suppression, MMP inhibition, pain relief and restoration of function. Overall, these complex observations provide new and interesting insights into corticosteroid effects on articular cartilage and collagen metabolism in the treated joint longitudinally *in vivo* and demonstrate that biomarkers can be used to provide valuable insights into the metabolic effects of IA medication.

II.6. Acknowledgement

Christophe Céleste was funded by the Fond du Centenaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. Sheila Laverty was funded by the Groupe de Recherche en Médecine Équine du Québec (GREMEQ), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal and the Canadian Arthritis Network. A. Robin Poole was funded by Shriners Hospitals for Children, National Institute for Ageing, National Institute of Health, Canadian Institute for Health Research and the Canadian Arthritis Network.

We would like to thank Guy Beauchamp for statistical assistance.

II.7. References

- [1] Altman RD. Measurement of structure (disease) modification in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12 Suppl A: S69-76
- [2] Barnes PJ, Greening AP, Crompton GK. Glucocorticoid resistance in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: S125-40
- [3] Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99: 1534-45.
- [4] Bird HA. Intra-articular and intralesional therapy. In: JH Klippel and PA Dieppe. *Rheumatology*. 2nd ed. London: Mosby International 1998
- [5] Chen CL, Sailor JA, Collier J, Wiegand J. Synovial and serum levels of triamcinolone following intra-articular administration of triamcinolone acetonide in the horse. *J Vet Pharmacol Ther* 1992; 15: 240-6.
- [6] Chikanza IC. Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor beta isoform. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 39-48.
- [7] Christodoulopoulos P, Leung DY, Elliott MW et al. Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 479-84
- [8] Chunekamrai S, Krook LP, Lust G, Maylin GA. Changes in articular cartilage after intra-articular injections of methylprednisolone acetate in horses. *Am J Vet Res* 1989; 50: 1733-41.
- [9] Dahlberg L, Billingham RC, Manner P et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis Rheum* 2000; 43: 673-82.
- [10] Dechant JE, Baxter GM, Frisbie DD et al. Effects of dosage titration of methylprednisolone acetate and triamcinolone acetonide on interleukin-1-conditioned equine articular cartilage explants in vitro. *Equine Vet J* 2003; 35: 444-50

- [11] Fawthrop F, Yaqub R, Belcher C et al. Chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in progressive versus non-progressive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 119-22.
- [12] Frisbie DD, Kawcak CE, Baxter GM et al. Effects of 6alpha-methylprednisolone acetate on an equine osteochondral fragment exercise model. *Am J Vet Res* 1998; 59: 1619-28.
- [13] Frisbie DD, Kawcak CE, Trotter GW et al. Effects of triamcinolone acetonide on an in vivo equine osteochondral fragment exercise model. *Equine Vet J* 1997; 29: 349-59.
- [14] Frisbie DD, Ray CS, Ionescu M et al. Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. *Am J Vet Res* 1999; 60: 306-9
- [15] Fubini SL, Boatwright CE, Todhunter RJ, Lust G. Effect of intramuscularly administered polysulfated glycosaminoglycan on articular cartilage from equine joints injected with methylprednisolone acetate. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1359-65.
- [16] Fubini SL, Todhunter RJ, Burton-Wurster N et al. Corticosteroids alter the differentiated phenotype of articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2001; 19: 688-95
- [17] Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ et al. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1600-4
- [18] Hearing SD, Norman M, Probert CS et al. Predicting therapeutic outcome in severe ulcerative colitis by measuring in vitro steroid sensitivity of proliferating peripheral blood lymphocytes. *Gut* 1999; 45: 382-8
- [19] Honda M, Orii F, Ayabe T et al. Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000; 118: 859-66
- [20] Jolly WT, Whittem T, Jolly AC, Firth EC. The dose-related effects of phenylbutazone and a methylprednisolone acetate formulation (Depo-Medrol) on cultured explants of equine carpal articular cartilage. *J Vet Pharmacol Ther* 1995; 18: 429-37.

- [21] Jones A, Doherty M. Intra-articular glucocorticoids and other injection therapies. In: KD Brandt, M Doherty and LS Lohmander. Osteoarthritis. 2nd ed. New York: Oxford University Press 2003
- [22] Lane SJ, Lee TH. Corticosteroid resistance in other disease states and tissues. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: S62-5
- [23] Laverty S, Ionescu M, Marcoux M et al. Alterations in cartilage type-II procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* 2000; 18: 399-405.
- [24] Laverty S, Okouneff S, Ionescu M et al. Excessive degradation of type II collagen in articular cartilage in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* 2002; 20: 1282-9
- [25] Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 3-22; quiz 3
- [26] Leung DY, Hamid Q, Vottero A et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med* 1997; 186: 1567-74.
- [27] Lillich JD, Bertone AL, Schmall LM et al. Plasma, urine, and synovial fluid disposition of methylprednisolone acetate and isoflupredone acetate after intra-articular administration in horses. *Am J Vet Res* 1996; 57: 187-92.
- [28] MacLeod JN, Fubini SL, Gu DN et al. Effect of synovitis and corticosteroids on transcription of cartilage matrix proteins. *Am J Vet Res* 1998; 59: 1021-6
- [29] Matyas JR, Atley L, Ionescu M et al. Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 543-52
- [30] Murphy DJ, Todhunter RJ, Fubini SL et al. The effects of methylprednisolone on normal and monocyte-conditioned medium-treated articular cartilage from dogs and horses. *Vet Surg* 2000; 29: 546-57.
- [31] Nelson F, Dahlberg L, Laverty S et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 2115-25
- [32] Neustadt DH. Intra-Articular Therapy. In: RW Moskowitz, DS Howell, RD Altman, et al. Osteoarthritis - Diagnosis and Medical/Surgical Management. 3rd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company 2001

- [33] Oikarinen AI, Vuorio EI, Zaragoza EJ et al. Modulation of collagen metabolism by glucocorticoids. Receptor-mediated effects of dexamethasone on collagen biosynthesis in chick embryo fibroblasts and chondrocytes. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 1451-62
- [34] Orii F, Ashida T, Nomura M et al. Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1286-94.
- [35] Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Protective effects of corticosteroids on cartilage lesions and osteophyte formation in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 181-93.
- [36] Poole AR. Cartilage in Health and Disease. In: WJ Koopman. *Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology*. 14th ed. Lippincot Williams & Wilkins 2001
- [37] Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest* 1994; 94: 25-33
- [38] Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61 Suppl 2: ii78-81.
- [39] Poole AR, Kojima T, Yasuda T et al. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop* 2001; S26-33
- [40] Poole AR, Nelson F, Dahlberg L et al. Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochem Soc Symp* 2003; 115-23
- [41] Raynauld JP, Buckland-Wright C, Ward R et al. Safety and efficacy of long-term intraarticular steroid injections in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 370-7
- [42] Richardson DW, Dodge GR. Dose-dependent effects of corticosteroids on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. *Inflamm Res* 2003; 52: 39-49
- [43] Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest* 1992; 90: 2268-77.
- [44] Robion FC, Doize B, Boure L et al. Use of synovial fluid markers of cartilage synthesis and turnover to study effects of repeated intra-articular administration of methylprednisolone acetate on articular cartilage in vivo. *J Orthop Res* 2001; 19: 250-8.

- [45] Roneus B, Lindblad A, Lindholm A, Jones B. Effects of intraarticular corticosteroid and sodium hyaluronate injections on synovial fluid production and synovial fluid content of sodium hyaluronate and proteoglycans in normal equine joints. *Zentralbl Veterinarmed A* 1993; 40: 10-6
- [46] Saari H, Tulamo RM, Kontinen YT, Sorsa T. Methylprednisolone acetate induced release of cartilage proteoglycans: determination by high performance liquid chromatography. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 214-9.
- [47] Sandler EA, Frisbie DD, McIlwraith CW. A dose titration of triamcinolone acetonide on insulin-like growth factor-1 and interleukin-1-conditioned equine cartilage explants. *Equine Vet J* 2004; 36: 58-63
- [48] Shoemaker RS, Bertone AL, Martin GS et al. Effects of intra-articular administration of methylprednisolone acetate on normal articular cartilage and on healing of experimentally induced osteochondral defects in horses. *Am J Vet Res* 1992; 53: 1446-53.
- [49] Sousa AR, Lane SJ, Cidlowski JA et al. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 943-50.
- [50] Srinivas GR, Chichester CO, Barrach HJ, Matoney AL. Effects of certain antiarthritic agents on the synthesis of type II collagen and glycosaminoglycans in rat chondrosarcoma cultures. *Agents Actions* 1994; 41: 193-9
- [51] Thonar EJ, Manicourt DH. Noninvasive Markers in Osteoarthritis. In: Moskowitz, Howell, Altman, et al. *Osteoarthritis. Diagnosis and Medical/Surgical Management*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company 2001
- [52] Todhunter RJ, Fubini SL, Vernier-Singer M et al. Acute synovitis and intra-articular methylprednisolone acetate in ponies. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 94-105
- [53] Todhunter RJ, Fubini SL, Wootton JA, Lust G. Effect of methylprednisolone acetate on proteoglycan and collagen metabolism of articular cartilage explants. *J Rheumatol* 1996; 23: 1207-13.
- [54] Todhunter RJ, Yeager AE, Freeman KP et al. Keratan sulfate as a marker of articular cartilage catabolism and joint treatment in ponies. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1007-16

- [55] Trotter GW. Intra-articular corticosteroids. In: CW McIlwraith and GW Trotter. Joint disease in the Horse. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company 1996
- [56] Trotter GW, McIlwraith CW, Yovich JV et al. Effects of intra-articular administration of methylprednisolone acetate on normal equine articular cartilage. *Am J Vet Res* 1991; 52: 83-7
- [57] Williams JM, Brandt KD. Triamcinolone hexacetonide protects against fibrillation and osteophyte formation following chemically induced articular cartilage damage. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 1267-74.
- [58] Young L, Katrib A, Cuello C et al. Effects of intraarticular glucocorticoids on macrophage infiltration and mediators of joint damage in osteoarthritis synovial membranes: findings in a double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 343-50

II.8. Figure captions

Figure 1:

- 1A Synovial fluid volume
- 1B CS 846 epitope concentration
- 1C KS epitope concentration
- 1D C1,2C epitope concentration
- 1E CP II epitope concentration

II.9. Figure legends

Figure 1

Diagram illustrating chronological events over a thirteen week period. Phenol red was injected (1) followed by joint aspiration (2) to measure by dilution joint synovial fluid volume. On treatment-days, the treatment (Triamcinolone Acetonide (TA) or saline injection) was performed (3) following joint aspiration. The joints were selected randomly to receive either TA or saline injection. Biomarker values from weeks 1 to 3 were considered baseline untreated control values (each joint was its own control). Weeks 4 to 13 were considered values post-treatment in the TA injected or controlateral saline injected control joints.

Figure 2

(A) Synovial fluid volumes of control and treated joints.

(B) CS 846 epitope concentration per joint in the SF of control and treated joints.

(C) KS epitope concentration per joint in the SF of control and treated joints.

(D) C1,2C epitope concentration per joint in the SF of control and treated joints.

(E) CP II epitope concentration per joint in the SF of control and treated joints.

(A to E) Injections times are indicated by arrows. Significant differences between control and treated joints values are indicated by * ($P < 0.05$ on a Wilcoxon signed rank test). Significant differences between baseline and post treatment values in treated joints are indicated by ^{At} ($P < 0.05$ on a one way ANOVA repeated-measures test). Significant differences between baseline values and post treatment values in control joints are indicated by ^{Ac} ($P < 0.05$ with an ANOVA repeated-measures test). Values are mean \pm S.D. (n=10).

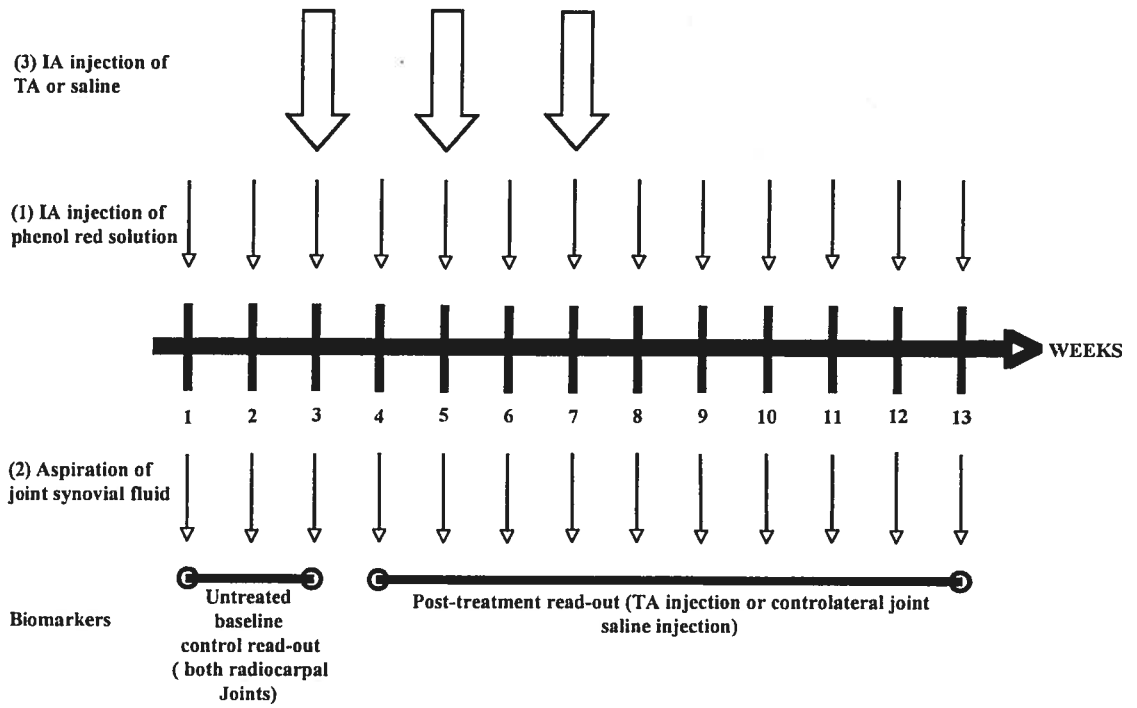
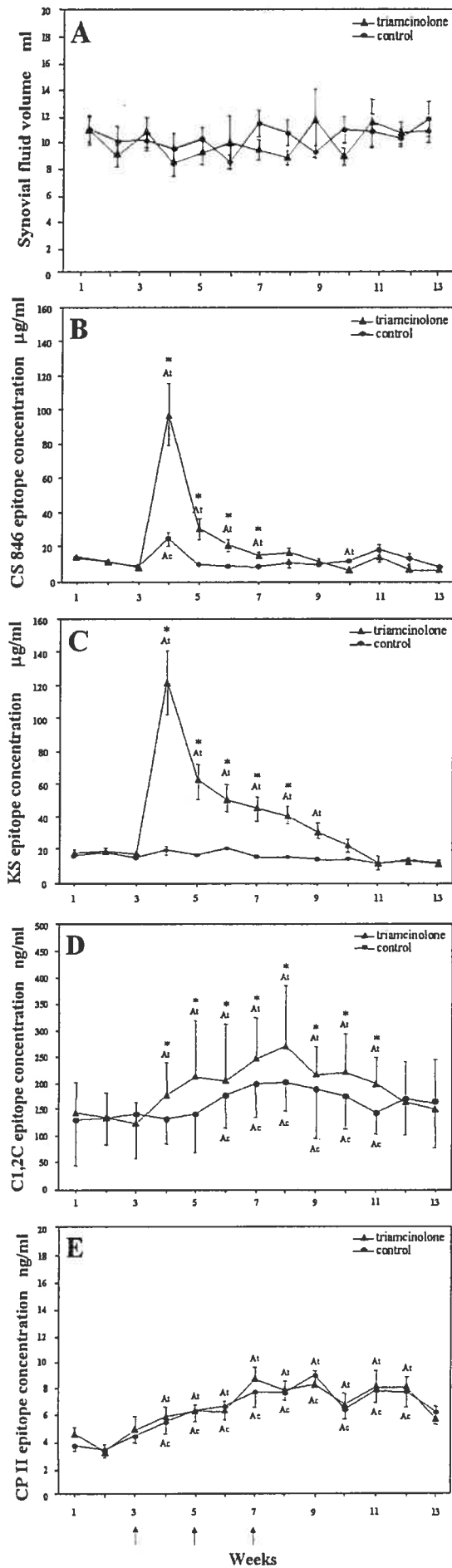


Figure 1

Figure 2



Chapitre III : Discussion

Nos résultats démontrent que les injections IA de TA ont des effets marqués sur le métabolisme du cartilage articulaire, en particulier celui des PG et du COLII. Ces effets ont été détectés par l'analyse séquentielle de biomarqueurs du métabolisme du cartilage libérés dans le liquide synovial.

Nos résultats viennent appuyer ceux d'une précédente étude (*Robion et al. 2001*) faite avec un autre GC couramment utilisé par voie IA chez le cheval, à savoir le MPA. Ces deux GC (TA et MPA) ont été injectés dans les articulations étudiées aux doses cliniquement recommandées et des effets significatifs sur le métabolisme du cartilage ont été observés une semaine après injection. Ces effets ont persisté, dans certains cas, plusieurs semaines après l'arrêt des injections IA. Ces études suggèrent qu'il y a perturbation du métabolisme cartilagineux par les GC lorsqu'ils sont injectés par voie IA aux doses communément utilisées en pratique. Ce qui soulève une fois de plus des interrogations sur l'innocuité de ces drogues, lorsqu'elles sont utilisées par cette voie, surtout à long terme, malgré les effets positifs observés, à savoir, en résumé, une réduction des symptômes cliniques de l'OA. L'identification d'effets métaboliques négatifs suite à l'injection IA de 12 mg de TA, suggère que la dose de 40 mg, plus fréquemment utilisée chez l'Homme, pourrait avoir des effets encore plus dramatiques sur le métabolisme du cartilage que ceux observés dans notre étude. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour le confirmer ou l'infirmer.

Les résultats de notre étude ont été obtenus chez des chevaux exempts de maladie articulaire, d'après les évaluations cliniques et radiographiques que nous avons réalisées préalablement à l'étude, ce qui constitue un biais à notre étude. Les effets des GC observés dans des articulations malades pourraient être différents. Il est aussi possible que des modifications cartilagineuses minimales accompagnant un processus dégénératif précoce n'aient pas été détectées par nos méthodes d'évaluation clinique et radiographiques).

Certaines études, menées *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*, ont rapporté que les GC normalisaient les altérations métaboliques générées par les processus inflammatoires au niveau cartilagineux, même si, lorsqu'ils sont utilisés seuls, ils tendent à perturber le

métabolisme du cartilage, en particulier celui des GAG (Trotter *et al.* 1991; Frisbie *et al.* 1997; MacLeod *et al.* 1998; Murphy *et al.* 2000). D'autres études ont rapporté l'inverse, à savoir que, les GC accentuaient les changements métaboliques induits par les processus inflammatoires de façon exponentielle au niveau du cartilage articulaire (Dechant *et al.* 2003). L'apparente controverse concernant les effets des GC sur le métabolisme du cartilage articulaire pourrait être expliquée, d'une part, par les différents protocoles expérimentaux et modèles animaux utilisés, et d'autre part, par les différents GC étudiés, les divers dosages et concentrations utilisés, ainsi que l'utilisation conjointe ou non d'autres drogues (Murphy *et al.* 2000; Fubini *et al.* 2001; Dechant *et al.* 2003; Richardson and Dodge 2003; Sandler *et al.* 2004). Dans cette étude, nous avons spécifiquement choisi d'utiliser un protocole expérimental similaire à celui d'une précédente étude (Robion *et al.* 2001), ainsi que des doses de GC quasi-identiques à celles utilisées en pratique courante, afin que nos résultats et les comparaisons faites aient une signification clinique.

Durant les trois premières semaines de notre étude, avant donc le début des injections IA de TA, le métabolisme du cartilage est demeuré stable, malgré les injections IA répétées de PR et les prélèvements de liquide synovial réalisés hebdomadairement (valeurs de base de tous les chevaux sans variation significative). Aucune évidence d'inflammation engendrée par nos diverses injections et arthrocentèses ne fut constatée, selon les analyses de liquide synovial réalisées. Nous avons donc conclu à l'innocuité de nos manipulations sur l'homéostasie des articulations étudiées.

Immédiatement (une semaine) après la première injection IA de TA, le métabolisme des PG et le catabolisme du collagène furent modifiés et accentués dans l'articulation traitée, comme le démontre la relâche augmentée des biomarqueurs KS, 846 et C1,2C dans le liquide synovial. Une précision doit être ici apportée : le biomarqueur C1,2C peut interagir par réaction dite croisée avec un épitope exposé suite au clivage à la fois des collagènes de type I et II. Il faut donc préciser que les modifications que nous avons observé dans la concentration du biomarqueur C1,2C pourraient être secondaires à des modifications du turnover du collagène de type I présent dans les tissus mous des articulations, à savoir, membrane synoviale, capsule articulaire et/ou ligaments. Cependant, à cause des modifications similaires de concentration observées du biomarqueur de la synthèse de COLII (CPII), nous pensons que celles observées pour C1,2C sont principalement

consécutives à des effets cartilagineux de la TA. Par conséquent, les injections IA de TA induisent, directement ou indirectement, une augmentation de la perte en PG résidents ou nouvellement synthétisés et celle de collagène de type I/II. En utilisant certains biomarqueurs des PG (GAGs), il a été précédemment rapporté que les GC induisaient la relâche de PG dans le liquide synovial (*Saari et al. 1992; Roneus et al. 1993; Robion et al. 2001*).

La dégradation du collagène, que reflète l'augmentation de la concentration de l'épitope C1,2C dans le liquide synovial, est devenue significative une semaine après la première injection IA de TA dans les articulations traitées. De façon inattendue mais fort intéressante, une augmentation moindre mais significative de la concentration de ce même épitope a été observée dans les articulations contrôles ne recevant que des injections de saline, évoquant un possible effet systémique de la TA sur le catabolisme du collagène. La TA stimule aussi l'anabolisme du COLII (biomarqueur CPII) dans les articulations traitées et dans les articulations contrôles, mais là, de manière identique. Ceci n'a pas été observé avec le métabolisme des PG.

Avant 2001 (*Robion et al. 2001*), les effets *in vivo* des GC sur le métabolisme du collagène n'avaient pas été étudiés, la technologie n'étant pas disponible.

La technologie employée, à savoir celle des biomarqueurs du métabolisme du cartilage, apporte donc de nouvelles informations sur ce qui se passe *in vivo*, ce qui peut être fort différent de ce qui se produit *in vitro* dans des conditions de laboratoire contrôlées.

Des études menées *in vitro* (*Oikarinen et al. 1988; Todhunter et al. 1996; Poole et al. 2002*) et *in vivo* (*Chunekamrai et al. 1989*) ont identifié un effet inhibiteur généralisé des divers GC utilisés en pratique courante, sur la synthèse du COLII au niveau cartilagineux (*Oikarinen et al. 1988; Srinivas et al. 1994*). Il a été démontré qu'à de fortes doses, les GC diminuaient de façon significative l'expression génomique des gènes codant pour le COLII au sein des chondrocytes équins (*Richardson and Dodge 2003*). Inversement, il a été rapporté que les injections IA de MPA augmentaient les niveaux d'hydroxyproline et la synthèse de COLII *in vivo* au sein du cartilage équin (*Trotter et al. 1991*). Les modifications de synthèse du collagène en réponse aux injections de GC semblent être

molécule-dépendant et dose-dépendante, de faibles concentrations en augmentant la synthèse, de fortes concentrations la diminuant (*Todhunter et al. 1996*).

Dans une précédente étude (*Robion et al. 2001*) et celle-ci, nous rapportons que le MPA supprime la synthèse du collagène alors que la TA la stimule, même si cela s'accompagne d'un catabolisme accentué.

Les altérations du métabolisme du collagène que nous avons observé suite aux injections IA de TA diffèrent des altérations du métabolisme des PG observées. Pour le collagène, la réponse est plus lente d'installation, d'importance moindre mais persiste plus longtemps. Que le degré relatif de réponse métabolique maximale aux injections IA soit moindre pour le métabolisme du collagène (deux fois) lorsque comparé au métabolisme des PG (neuf fois) n'est pas surprenant, le métabolisme des PG étant considéré comme beaucoup plus rapide que celui du collagène dans le cartilage articulaire (*Poole 2001*). Le métabolisme du collagène ne devrait donc pas répondre aussi rapidement, ou dans une même amplitude, que le métabolisme des PG.

Les mécanismes actuels de la réponse métabolique du cartilage articulaire observée suite aux injections IA de GC restent à élucider. La dégradation du COLII, lors de maladie articulaire, est contrôlée par les collagénases, telle que MMP 13 (collagénase 3) ou MMP 1, qui initient le clivage primaire des fibrilles de collagène (*Poole et al. 2003*). Peu d'informations sont actuellement disponibles quant à la dégradation du collagène de type I. Les GC diminuent normalement l'expression génomique des gènes codant pour les MMP et les TIMP dans le cartilage normal et le cartilage atteint d'arthrite rhumatoïde, mais pas dans le cartilage atteint d'ostéoarthrite (MMP 1, MMP 3, TIMP 1, TIMP 2) (*Young et al. 2001*). Il est donc difficile d'expliquer l'accroissement de la dégradation du collagène observé dans notre étude par ce mécanisme. A la suite d'injection IA de 6 mg de TA dans des articulations de chevaux, la concentration synoviale moyenne de triamcinolone oscille entre 10^{-8} à 10^{-6} M, et ce jusqu'au 14^{ème} jour post injection (*Chen et al. 1992*).

Cette concentration correspond à celles rapportées comme diminuant *in vitro* l'expression des ARNm codant pour MMP 1, MMP 3, MMP 13 et TIMP-1 chez les chondrocytes équins, ainsi qu'à celles rapportées comme diminuant *in vitro* l'expression du COLII et des

PG (*Richardson and Dodge 2003*). D'après ces résultats, l'implication des MMP dans la libération dans le liquide synovial des biomarqueurs étudiés, semble plus que douteuse. De précédentes études (*Todhunter et al. 1993; Todhunter et al. 1996; Robion et al. 2001*) ont rapporté que le MPA injecté par voie IA induisait une relâche de petits PG dans le liquide synovial, suggérant que les PG pourraient être plus sensibles à la protéolyse, provoquant de ce fait une augmentation des concentrations d'épitopes de PG dans le liquide synovial.

Il est intéressant de constater que la relâche des biomarqueurs KS et 846 dans le liquide synovial fut décroissante avec le temps et le nombre d'injections IA (forte relâche suite à la première injection, relâche plus faible suite à la seconde, relâche moindre encore suite à la troisième). Cependant, les concentrations de biomarqueurs de PG relâchés demeurèrent significativement plus élevées que les concentrations basales de référence et ce jusqu'à une semaine post-injection. Cette progressive insensibilité du métabolisme des PG aux injections IA répétées de GC pourrait être vue comme un effet favorable à long terme.

L'insensibilité clinique progressive et le développement d'une résistance aux GC sont reconnus et largement documentés dans le traitement de certaines maladies, en particulier les maladies inflammatoires et auto-immunes, tels l'asthme (*Barnes et al. 1995; Hamid et al. 1999; Christodoulouopoulos et al. 2000; Sousa et al. 2000; Leung and Bloom 2003*), le syndrome digestif inflammatoire (*Hearing et al. 1999; Honda et al. 2000; Orii et al. 2002*) et l'arthrite rhumatoïde (*Lane and Lee 1996; Chikanza 2002*). Ce qui représente un réel challenge clinique dans le traitement de ces maladies qui peuvent être d'évolution mortelle (*Leung et al. 1997*). Les mécanismes exacts de résistance aux GC restent à élucider (*Leung and Bloom 2003*). Des travaux supplémentaires seraient requis pour déterminer l'effet éventuel de la TA sur la clairance des biomarqueurs, de la matrice cartilagineuse extracellulaire vers l'espace articulaire, ou, à travers la membrane synoviale et les vaisseaux lymphatiques.

Nous avons étudié des articulations anatomiquement paires. Il a été rapporté que les GC n'étaient pas détectés dans l'articulation controlatérale après une injection IA faite unilatéralement (*Lillich et al. 1996*). Malgré l'absence de molécule native dans

l'articulation controlatérale, des effets secondaires sur le contenu en GAG du cartilage articulaire (*Frisbie et al. 1998*) et sur l'anabolisme du COLII (*Robion et al. 2001*), attribués aux GC injectés, y ont été observés, suggérant un éventuel effet systémique des drogues injectées par voie IA .

Notre étude s'ajoute aux précédentes quant au métabolisme du collagène. Nous avons mis en évidence une augmentation significative de la synthèse et du clivage du COLII dans les articulations traitées et dans les articulations contrôles. L'effet systémique observé de la TA sur l'anabolisme du COLII peut être vu comme un effet bénéfique de ce GC. L'inclusion d'un groupe additionnel de chevaux recevant uniquement des injections IA de saline aurait probablement permis d'établir plus clairement l'origine des variations de concentration des biomarqueurs du métabolisme du collagène détectées dans les articulations controlatérales à celles injectées avec la TA (effets systémiques de la triamcinolone injectée, facteur non élucidé dans notre modèle expérimental). La comparaison des concentrations en biomarqueurs du métabolisme du collagène dans les articulations traitées avec celles de base dans les articulations non traitées (semaines 1 à 3) suggère un effet systémique de la TA.

Les effets secondaires délétères des injections IA de corticostéroïdes doivent cependant être remis dans leur contexte et comparés à leurs effets bénéfiques tel que suppression de l'inflammation, inhibition des MMP, soulagement de la douleur et restauration du bon fonctionnement de l'articulation atteinte.

Conclusion

Dans l'ensemble, nos observations apportent de nouvelles informations sur les effets des GC sur le métabolisme du cartilage articulaire dans les articulations traitées, *in vivo*, chez le cheval. Nos résultats suggèrent que la TA, à l'image du MPA (*Robion et al. 2001*), altère le métabolisme du cartilage articulaire, mais, qu'à la différence de celui-ci, la TA provoque une augmentation de la synthèse de COLII dans les articulations traitées et les articulations contrôles, suggérant un possible effet systémique du médicament injecté localement sur le métabolisme du COLII.

Les résultats combinés de notre étude et de celle de Robion (*Robion et al. 2001*) démontrent que la mesure longitudinale des biomarqueurs dans le liquide synovial permet de suivre la réponse métabolique du cartilage articulaire aux médications IA, prouvant l'utilité de cette nouvelle technologie dans l'étude des maladies arthritiques, leur diagnostic, leurs avenues thérapeutiques et leur évolution.

Bibliographie

Adams, M.E., Matyas, J.R., Huang, D. and Dourado, G.S. (1995) Expression of proteoglycans and collagen in the hypertrophic phase of experimental osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* **43**:94-7.

Aigner, T., Zhu, Y., Chansky, H.H., Matsen, F.A., 3rd, Maloney, W.J. and Sandell, L.J. (1999) Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* **42**:1443-50.

Aigner, T., Kurz, B., Fukui, N. and Sandell, L. (2002) Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* **14**:578-84.

Amano, Y., Lee, S.W. and Allison, A.C. (1993) Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. *Mol Pharmacol* **43**:176-82.

Antoniou, J., Steffen, T., Nelson, F., Winterbottom, N., Hollander, A.P., Poole, R.A., Aebi, M. and Alini, M. (1996) The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest* **98**:996-1003.

Arai, K., Misumi, K., Carter, S.D., Shinbara, S., Fujiki, M. and Sakamoto, H. (2005) Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation and synthesis in equine joint disease. *Equine Vet J* **37**:31-6.

Autfage, A., Alvinerie, M. and Toutain, P.L. (1986) Synovial fluid and plasma kinetics of methylprednisolone and methylprednisolone acetate in horses following intra-articular administration of methylprednisolone acetate. *Equine Vet J* **18**:193-8.

Badley, E. (2003) L'arthrite au Canada - Une bataille à gagner. In: *L'arthrite au Canada*. S Canada, editor. Santé Canada, Ottawa. pp vi-xii.

Balkman, C.E. and Nixon, A.J. (1998) Molecular cloning and cartilage gene expression of equine stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3). *Am J Vet Res* **59**:30-6.

Bamberger, C.M., Bamberger, A.M., de Castro, M. and Chrousos, G.P. (1995) Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* **95**:2435-41.

Barone, R. (1980) Caractères généraux des articulations. In: *Anatomie comparée des mammifères domestiques - Tome second: Arthrologie et Myologie*. É Vigot, editor, Paris. pp 3-23.

Barnes, P.J., Greening, A.P. and Crompton, G.K. (1995) Glucocorticoid resistance in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **152**:S125-40.

Bashir, A., Gray, M.L. and Burstein, D. (1996) Gd-DTPA2- as a measure of cartilage degradation. *Magn Reson Med* **36**:665-73.

Batiste, D.L., Kirkley, A., Lavery, S., Thain, L.M., Spouge, A.R., Gati, J.S., Foster, P.J. and Holdsworth, D.W. (2004) High-resolution MRI and micro-CT in an ex vivo rabbit anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12**:614-26.

Batiste, D.L., Kirkley, A., Lavery, S., Thain, L.M., Spouge, A.R. and Holdsworth, D.W. (2004) Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *Osteoarthritis Cartilage* **12**:986-96.

Bautch, J.C., Clayton, M.K., Chu, Q. and Johnson, K.A. (2000) Synovial fluid chondroitin sulphate epitopes 3B3 and 7D4, and glycosaminoglycan in human knee osteoarthritis after exercise. *Ann Rheum Dis* **59**:887-91.

Beato, M., Herrlich, P. and Schutz, G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**:851-7.

Bellamy, N. and Watson Buchanan, W. (2001) Clinical evaluation in the rheumatic disease. In: *Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 51-82.

Belvisi, M.G., Brown, T.J., Wicks, S. and Foster, M.L. (2001) New Glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio? *Pulm Pharmacol Ther* **14**:221-7.

Billinghurst, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., Chen, J., Van Wart, H. and Poole, A.R. (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* **99**:1534-45.

Billinghurst, R.C., Brama, P.A., van Weeren, P.R., Knowlton, M.S. and McIlwraith, C.W. (2003) Significant exercise-related changes in the serum levels of two biomarkers of collagen metabolism in young horses. *Osteoarthritis Cartilage* **11**:760-9.

Billinghurst, R.C., Brama, P.A., van Weeren, P.R., Knowlton, M.S. and McIlwraith, C.W. (2004) Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals. *Am J Vet Res* **65**:143-50.

Bleasel, J.F., Poole, A.R., Heinegard, D., Saxne, T., Holderbaum, D., Ionescu, M., Jones, P. and Moskowitz, R.W. (1999) Changes in serum cartilage marker levels indicate altered cartilage metabolism in families with the osteoarthritis-related type II collagen gene COL2A1 mutation. *Arthritis Rheum* **42**:39-45.

Bonica, J.J. (1990) Evolution and current status of pain programs. *J Pain Symptom Manage* **5**:368-74.

Borden, P. and Heller, R.A. (1997) Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **7**:159-78.

Boumpas, D.T. and Wilder, R.L. (2001) Corticosteroids. In: *Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology* 14th ed. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 827-43.

Brandt, K.D. (2002) Animal models of osteoarthritis. *Biorheology* **39**:221-35.

Breedveld, F.C. (2004) Osteoarthritis--the impact of a serious disease. *Rheumatology (Oxford)* **43 Suppl 1**:i4-8.

Brooks, P.M. (2002) Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol* **14**:573-7.

Buckwalter, J.A. and Mankin, H.J. (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* **47**:477-86.

Campion, G.V., McCrae, F., Schnitzer, T.J., Lenz, M.E., Dieppe, P.A. and Thonar, E.J. (1991) Levels of keratan sulfate in the serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* **34**:1254-9.

Caron, J.P., Tardif, G., Martel-Pelletier, J., DiBattista, J.A., Geng, C. and Pelletier, J.P. (1996) Modulation of matrix metalloprotease 13 (collagenase 3) gene expression in equine chondrocytes by interleukin 1 and corticosteroids. *Am J Vet Res* **57**:1631-4.

Caron, J.P. (1999) Synovial joint biology and pathobiology. In: *Equine Surgery*. J.A. Auer & J.A. Stick, editor: Saunders, Philadelphia. pp 665-78.

Caron, J.P. and Genovese, R.L. (2003) Principles and practices of joint disease treatment. In: *Diagnosis and management of lameness in the horse*. S Dyson, editor. Saunders, Philadelphia. pp 746-64.

Caterson, B., Christner, J.E. and Baker, J.R. (1983) Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulfate. Monoclonal antibodies to cartilage proteoglycan. *J Biol Chem* **258**:8848-54.

Chen, C.L., Sailor, J.A., Collier, J. and Wiegand, J. (1992) Synovial and serum levels of triamcinolone following intra-articular administration of triamcinolone acetonide in the horse. *J Vet Pharmacol Ther* **15**:240-6.

Chikanza, I.C. (2002) Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor beta isoform. *Ann N Y Acad Sci* **966**:39-48.

Christodoulopoulos, P., Leung, D.Y., Elliott, M.W., Hogg, J.C., Muro, S., Toda, M., Laberge, S. and Hamid, Q.A. (2000) Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* **106**:479-84.

Chu, Q., Lopez, M., Hayashi, K., Ionescu, M., Billingham, R.C., Johnson, K.A., Poole, A.R. and Markel, M.D. (2002) Elevation of a collagenase generated type II collagen

neopeptide and proteoglycan epitopes in synovial fluid following induction of joint instability in the dog. *Osteoarthritis Cartilage* **10**:662-9.

Chunekamrai, S., Krook, L.P., Lust, G. and Maylin, G.A. (1989) Changes in articular cartilage after intra-articular injections of methylprednisolone acetate in horses. *Am J Vet Res* **50**:1733-41.

Clark, J.O. and Clark, T.P. (1999) Analgesia. *Vet Clin North Am Equine Pract* **15**:705-23.

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

Clegg, P.D., Jones, M.D. and Carter, S.D. (1998) The effect of drugs commonly used in the treatment of equine articular disorders on the activity of equine matrix metalloproteinase-2 and 9. *J Vet Pharmacol Ther* **21**:406-13.

Dahlberg, L., Billingham, R.C., Manner, P., Nelson, F., Webb, G., Ionescu, M., Reiner, A., Tanzer, M., Zukor, D., Chen, J., van Wart, H.E. and Poole, A.R. (2000) Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis Rheum* **43**:673-82.

Dechant, J.E., Baxter, G.M., Frisbie, D.D., Trotter, G.W. and McIlwraith, C.W. (2003) Effects of dosage titration of methylprednisolone acetate and triamcinolone acetonide on interleukin-1-conditioned equine articular cartilage explants in vitro. *Equine Vet J* **35**:444-50.

Dewire, P. and Einhorn, T.A. (2001) The joint as an organ. In: *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management* 3rd Edition ed. H Moskowitz, Altman, Buckwalter, Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia

DiBattista, J.A., Martel-Pelletier, J., Cloutier, J.M. and Pelletier, J.P. (1991) Modulation of glucocorticoid receptor expression in human articular chondrocytes by cAMP and prostaglandins. *J Rheumatol Suppl* **27**:102-5.

Dodge, G.R. and Poole, A.R. (1989) Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* **83**:647-61.

Dunlop, H. (2004) Infliximab (Remicade) and etanercept (Enbrel): serious infections and tuberculosis. *Cmaj* **171**:992-3.

Elsaid, K.A., Jay, G.D. and Chichester, C.O. (2003) Detection of collagen type II and proteoglycans in the synovial fluids of patients diagnosed with non-infectious knee joint synovitis indicates early damage to the articular cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage* **11**:673-80.

Eyre, D.R., Koob, T.J. and Van Ness, K.P. (1984) Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **137**:380-8.

Eyre, D.R., Dickson, I.R. and Van Ness, K. (1988) Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J* **252**:495-500.

Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., Naimark, A., Weissman, B., Aliabadi, P. and Levy, D. (1997) Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* **40**:728-33.

Felson, D.T., McLaughlin, S., Goggins, J., LaValley, M.P., Gale, M.E., Totterman, S., Li, W., Hill, C. and Gale, D. (2003) Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* **139**:330-6.

Ferraro-Peyret, C., Coury, F., Tebib, J.G., Bienvenu, J. and Fabien, N. (2004) Infliximab therapy in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis-induced specific antinuclear and antiphospholipid autoantibodies without autoimmune clinical manifestations: a two-year prospective study. *Arthritis Res Ther* **6**:R535-43.

Flores, R.H. and Hochberg, M.C. (2003) Definition and classification of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis* 2nd ed. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 1-8.

Foland, J.W., McIlwraith, C.W., Trotter, G.W., Powers, B.E. and Lamar, C.H. (1994) Effect of betamethasone and exercise on equine carpal joints with osteochondral fragments. *Vet Surg* **23**:369-76.

Frankel, V.H. (1998) Biomechanics. In: *Rheumatology* 2nd ed. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 1.11.11-1.11.8.

Fraser, A., Fearon, U., Billingham, R.C., Ionescu, M., Reece, R., Barwick, T., Emery, P., Poole, A.R. and Veale, D.J. (2003) Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation. *Arthritis Rheum* **48**:3085-95.

Frean, S.P. and Lees, P. (2000) Effects of polysulfated glycosaminoglycan and hyaluronan on prostaglandin E2 production by cultured equine synoviocytes. *Am J Vet Res* **61**:499-505.

Freemont, A.J., Byers, R.J., Taiwo, Y.O. and Hoyland, J.A. (1999) In situ zymographic localisation of type II collagen degrading activity in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* **58**:357-65.

Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Trotter, G.W., Powers, B.E., Walton, R.M. and McIlwraith, C.W. (1997) Effects of triamcinolone acetate on an in vivo equine osteochondral fragment exercise model. *Equine Vet J* **29**:349-59.

Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Baxter, G.M., Trotter, G.W., Powers, B.E., Lassen, E.D. and McIlwraith, C.W. (1998) Effects of 6alpha-methylprednisolone acetate on an equine osteochondral fragment exercise model. *Am J Vet Res* **59**:1619-28.

Frisbie, D.D., Ray, C.S., Ionescu, M., Poole, A.R., Chapman, P.L. and McIlwraith, C.W. (1999) Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. *Am J Vet Res* **60**:306-9.

Fubini, S.L., Boatwright, C.E., Todhunter, R.J. and Lust, G. (1993) Effect of intramuscularly administered polysulfated glycosaminoglycan on articular cartilage from equine joints injected with methylprednisolone acetate. *Am J Vet Res* **54**:1359-65.

Fubini, S.L., Todhunter, R.J., Burton-Wurster, N., Vernier-Singer, M. and MacLeod, J.N. (2001) Corticosteroids alter the differentiated phenotype of articular chondrocytes. *J Orthop Res* **19**:688-95.

Fuller, C.J., Barr, A.R., Sharif, M. and Dieppe, P.A. (2001) Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage* **9**:49-55.

Gagliardo, R., Vignola, A.M. and Mathieu, M. (2001) Is there a role for glucocorticoid receptor beta in asthma? *Respir Res* **2**:1-4.

Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Duboeuf, F. and Delmas, P.D. (1999) Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years: the OFELY study. *J Bone Miner Res* **14**:1614-21.

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

Garnero, P., Ayrat, X., Rousseau, J.C., Christgau, S., Sandell, L.J., Dougados, M. and Delmas, P.D. (2002) Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **46**:2613-24.

Ghosh, P. (1994) The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol* **12**:75-82.

Glant, T.T., Mikecz, K., Roughley, P.J., Buzas, E. and Poole, A.R. (1986) Age-related changes in protein-related epitopes of human articular- cartilage proteoglycans. *Biochem J* **236**:71-5.

Goldring, M.B. (2000) Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* **2**:459-65.

Goldring, S.R. (2002) Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening? *J Rheumatol Suppl* **65**:44-8.

- Goldring, S.R. and Goldring, M.B. (2004) The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop*:S27-36.
- Gough, A.K., Peel, N.F., Eastell, R., Holder, R.L., Lilley, J. and Emery, P. (1994) Excretion of pyridinium crosslinks correlates with disease activity and appendicular bone loss in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **53**:14-7.
- Hakala, B.E., White, C. and Recklies, A.D. (1993) Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* **268**:25803-10.
- Hamid, Q.A., Wenzel, S.E., Hauk, P.J., Tsicopoulos, A., Wallaert, B., Lafitte, J.J., Chrousos, G.P., Szeffler, S.J. and Leung, D.Y. (1999) Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **159**:1600-4.
- Harvey, S., Weisman, M., O'Dell, J., Scott, T., Krusemeier, M., Visor, J. and Swindlehurst, C. (1998) Chondrex: new marker of joint disease. *Clin Chem* **44**:509-16.
- Hashimoto, S., Ochs, R.L., Komiya, S. and Lotz, M. (1998) Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **41**:1632-8.
- Hazell, P.K., Dent, C., Fairclough, J.A., Bayliss, M.T. and Hardingham, T.E. (1995) Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury. *Arthritis Rheum* **38**:953-9.
- Hearing, S.D., Norman, M., Probert, C.S., Haslam, N. and Dayan, C.M. (1999) Predicting therapeutic outcome in severe ulcerative colitis by measuring in vitro steroid sensitivity of proliferating peripheral blood lymphocytes. *Gut* **45**:382-8.
- Hecht, K., Carlstedt-Duke, J., Stierna, P., Gustafsson, J., Bronnegard, M. and Wikstrom, A.C. (1997) Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor. *J Biol Chem* **272**:26659-64.
- Honda, M., Orii, F., Ayabe, T., Imai, S., Ashida, T., Obara, T. and Kohgo, Y. (2000) Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology* **118**:859-66.
- Hough, A.J. (2001) Pathology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd ed. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 69-99.
- Ishiguro, N., Ito, T., Ito, H., Iwata, H., Jugessur, H., Ionescu, M. and Poole, A.R. (1999) Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **42**:129-36.
- Ishiguro, N., Ito, T., Oguchi, T., Kojima, T., Iwata, H., Ionescu, M. and Poole, A.R. (2001) Relationships of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage

proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **44**:2503-11.

Jackson, B.F., Goodship, A.E., Eastell, R. and Price, J.S. (2003) Evaluation of serum concentrations of biochemical markers of bone metabolism and insulin-like growth factor I associated with treadmill exercise in young horses. *Am J Vet Res* **64**:1549-56.

Johansen, J.S., Hvolris, J., Hansen, M., Backer, V., Lorenzen, I. and Price, P.A. (1996) Serum YKL-40 levels in healthy children and adults. Comparison with serum and synovial fluid levels of YKL-40 in patients with osteoarthritis or trauma of the knee joint. *Br J Rheumatol* **35**:553-9.

Johansen, J.S., Jensen, H.S. and Price, P.A. (1993) A new biochemical marker for joint injury. Analysis of YKL-40 in serum and synovial fluid. *Br J Rheumatol* **32**:949-55.

Johnston, S.A. (1997) Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **27**:699-723.

Jolly, W.T., Whitem, T., Jolly, A.C. and Firth, E.C. (1995) The dose-related effects of phenylbutazone and a methylprednisolone acetate formulation (Depo-Medrol) on cultured explants of equine carpal articular cartilage. *J Vet Pharmacol Ther* **18**:429-37.

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

Kalunian, K.C., Brion, P.H. and Moreland, L.W. (2001) Arthroscopy. In: *Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 105-17.

Kapyla, J., Jaalinoja, J., Tulla, M., Ylostalo, J., Nissinen, L., Viitasalo, T., Vehvilainen, P., Marjomaki, V., Nykvist, P., Saamanen, A.M., Farndale, R.W., Birk, D.E., Ala-Kokko, L. and Heino, J. (2004) The fibril-associated collagen IX provides a novel mechanism for cell adhesion to cartilaginous matrix. *J Biol Chem* **279**:51677-87.

Kawcak, C.E., Norrdin, R.W., Frisbie, D.D., Trotter, G.W. and McIlwraith, C.W. (1998) Effects of osteochondral fragmentation and intra-articular triamcinolone acetonide treatment on subchondral bone in the equine carpus. *Equine Vet J* **30**:66-71.

Kobayashi, M., Squires, G.R., Mousa, A., Tanzer, M., Zukor, D.J., Antoniou, J., Feige, U. and Poole, A.R. (2005) Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* **52**:128-35.

Kojima, T., Mwale, F., Yasuda, T., Girard, C., Poole, A.R. and Laverty, S. (2001) Early degradation of type IX and type II collagen with the onset of experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **44**:120-7.

Landewe, R., Geusens, P., Boers, M., van der Heijde, D., Lems, W., te Koppele, J., van der Linden, S. and Garnero, P. (2004) Markers for type II collagen breakdown predict the effect of disease-modifying treatment on long-term radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **50**:1390-9.

Lane, S.J. and Lee, T.H. (1996) Corticosteroid resistance in other disease states and tissues. *Am J Respir Crit Care Med* **154**:S62-5.

Lavery, S., Ionescu, M., Marcoux, M., Boure, L., Doize, B. and Poole, A.R. (2000) Alterations in cartilage type-II procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **18**:399-405.

Lavery, S., Okouneff, S., Ionescu, M., Reiner, A., Pidoux, I., Webber, C., Rossier, Y., Billingham, R.C. and Poole, A.R. (2002) Excessive degradation of type II collagen in articular cartilage in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **20**:1282-9.

Lavery, S., Sandy, J.D., Celeste, C., Vachon, P., Marier, J.F. and Plaas, A.H. (2005) Synovial fluid levels and serum pharmacokinetics in a large animal model following treatment with oral glucosamine at clinically relevant doses. *Arthritis Rheum* **52**:181-91.

Leung, D.Y. and Bloom, J.W. (2003) Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* **111**:3-22; quiz 23.

Leung, D.Y., Hamid, Q., Vottero, A., Szeffler, S.J., Surs, W., Minshall, E., Chrousos, G.P. and Klemm, D.J. (1997) Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med* **186**:1567-74.

Lillich, J.D., Bertone, A.L., Schmall, L.M., Ruggles, A.J. and Sams, R.A. (1996) Plasma, urine, and synovial fluid disposition of methylprednisolone acetate and isoflupredone acetate after intra-articular administration in horses. *Am J Vet Res* **57**:187-92.

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

Lohmander, L.S., Yoshihara, Y., Roos, H., Kobayashi, T., Yamada, H. and Shinmei, M. (1996) Procollagen II C-propeptide in joint fluid: changes in concentration with age, time after knee injury, and osteoarthritis. *J Rheumatol* **23**:1765-9.

Lohmander, L.S., Ionescu, M., Jugessur, H. and Poole, A.R. (1999) Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **42**:534-44.

Lohmander, S. (2002) [Many paths converge in arthritis. Awareness of risk factors and illness mechanisms increase steadily]. *Lakartidningen* **99**:4480-3.

Lugardon, S., Lapeyre-Mestre, M. and Montastruc, J.L. (2004) Upper gastrointestinal adverse drug reactions and cyclo-oxygenase-2 inhibitors (celecoxib and rofecoxib): a case/non-case study from the French Pharmacovigilance Database. *Eur J Clin Pharmacol* **60**:673-7.

Lynch, T.M., Caron, J.P., Arnoczky, S.P., Lloyd, J.W., Stick, J.A. and Render, J.A. (1998) Influence of exogenous hyaluronan on synthesis of hyaluronan and collagenase by equine synoviocytes. *Am J Vet Res* **59**:888-92.

MacLeod, J.N., Fubini, S.L., Gu, D.N., Tetreault, J.W. and Todhunter, R.J. (1998) Effect of synovitis and corticosteroids on transcription of cartilage matrix proteins. *Am J Vet Res* **59**:1021-6.

Malfait, A.M., Liu, R.Q., Ijiri, K., Komiya, S. and Tortorella, M.D. (2002) Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* **277**:22201-8.

Manicourt, D.H., Lenz, M.E. and Thonar, E.J. (1991) Levels of serum keratan sulfate rise rapidly and remain elevated following anterior cruciate ligament transection in the dog. *J Rheumatol* **18**:1872-6.

Mansson, B., Carey, D., Alini, M., Ionescu, M., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., Heinegard, D. and Saxne, T. (1995) Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest* **95**:1071-7.

Masferrer, J.L., Reddy, S.T., Zweifel, B.S., Seibert, K., Needleman, P., Gilbert, R.S. and Herschman, H.R. (1994) In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* **270**:1340-4.

Masferrer, J.L. and Seibert, K. (1994) Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Receptor* **4**:25-30.

Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C. and Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:3228-32.

Matyas, J.R., Adams, M.E., Huang, D. and Sandell, L.J. (1995) Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **38**:420-5.

Matyas, J.R., Sandell, L.J. and Adams, M.E. (1997) Gene expression of type II collagens in chondro-osteophytes in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **5**:99-105.

Matyas, J.R., Ehlers, P.F., Huang, D. and Adams, M.E. (1999) The early molecular natural history of experimental osteoarthritis. I. Progressive discoordinate expression of aggrecan and type II procollagen messenger RNA in the articular cartilage of adult animals. *Arthritis Rheum* **42**:993-1002.

Matyas, J.R., Atley, L., Ionescu, M., Eyre, D.R. and Poole, A.R. (2004) Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **50**:543-52.

McGonagle, D. and Emery, P. (1999) Classification of inflammatory arthritis. *Lancet* **353**:671.

Mehindate, K., al-Daccak, R., Aoudjit, F., Damdoui, F., Fortier, M., Borgeat, P. and Mourad, W. (1996) Interleukin-4, transforming growth factor beta 1, and dexamethasone inhibit superantigen-induced prostaglandin E2-dependent collagenase gene expression through their action on cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2. *Lab Invest* **75**:529-38.

Mengshol, J.A., Mix, K.S. and Brinckerhoff, C.E. (2002) Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: bull's-eye or missing the mark? *Arthritis Rheum* **46**:13-20.

Misumi, K., Vilim, V., Hatazoe, T., Murata, T., Fujiki, M., Oka, T., Sakamoto, H. and Carter, S.D. (2002) Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine osteoarthritis. *Equine Vet J* **34**:602-8.

Morris, E.A. and Treadwell, B.V. (1994) Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res* **55**:138-46.

Mourao, P.A. (1988) Distribution of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in human articular and growth cartilage. *Arthritis Rheum* **31**:1028-33.

Mow, V.C. and Ratcliffe, A. (1997) Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: *Basic Orthopaedic Biomechanics* 2nd ed. WC Hayes, editor. pp 113-77.

Mow, V.C. and Hung, C.T. (2003) Mechanical properties of normal and osteoarthritic articular cartilage, and the mechanobiology of chondrocytes. In: *Osteoarthritis* 2nd ed. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 102-12.

Murphy, D.J., Todhunter, R.J., Fubini, S.L., Vernier-Singer, M., Straubinger, R.K. and Lust, G. (2000) The effects of methylprednisolone on normal and monocyte-conditioned medium-treated articular cartilage from dogs and horses. *Vet Surg* **29**:546-57.

Murray, R.C., DeBowes, R.M., Gaughan, E.M., Zhu, C.F. and Athanasiou, K.A. (1998) The effects of intra-articular methylprednisolone and exercise on the mechanical properties of articular cartilage in the horse. *Osteoarthritis Cartilage* **6**:106-14.

Mwale, F., Tchetina, E., Wu, C.W. and Poole, A.R. (2002) The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res* **17**:275-83.

Myers, S.L., O'Connor, B.L. and Brandt, K.D. (1996) Accelerated clearance of albumin from the osteoarthritic knee: implications for interpretation of concentrations of "cartilage markers" in synovial fluid. *J Rheumatol* **23**:1744-8.

Myers, S.L., Brandt, K.D. and Albrecht, M.E. (2000) Synovial fluid glycosaminoglycan concentration does not correlate with severity of chondropathy or predict progression of osteoarthritis in a canine cruciate deficiency model. *J Rheumatol* **27**:753-63.

- Müller-Ladner, U., Gay, R.E. and Gay, S. (2001) Structure and function of Synoviocytes. In: *Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 285-300.
- Nakazawa, F., Matsuno, H., Yudoh, K., Watanabe, Y., Katayama, R. and Kimura, T. (2002) Corticosteroid treatment induces chondrocyte apoptosis in an experimental arthritis model and in chondrocyte cultures. *Clin Exp Rheumatol* **20**:773-81.
- Nelson, F., Dahlberg, L., Laverty, S., Reiner, A., Pidoux, I., Ionescu, M., Fraser, G.L., Brooks, E., Tanzer, M., Rosenberg, L.C., Dieppe, P. and Robin Poole, A. (1998) Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* **102**:2115-25.
- Newton, R. (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* **55**:603-13.
- Nieminen, M.T., Toyras, J., Laasanen, M.S., Silvennoinen, J., Helminen, H.J. and Jurvelin, J.S. (2004) Prediction of biomechanical properties of articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging. *J Biomech* **37**:321-8.
- Nissi, M.J., Toyras, J., Laasanen, M.S., Rieppo, J., Saarakkala, S., Lappalainen, R., Jurvelin, J.S. and Nieminen, M.T. (2004) Proteoglycan and collagen sensitive MRI evaluation of normal and degenerated articular cartilage. *J Orthop Res* **22**:557-64.
- Oakley, R.H., Jewell, C.M., Yudt, M.R., Bofetiado, D.M. and Cidlowski, J.A. (1999) The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* **274**:27857-66.
- Oesser, S. and Seifert, J. (2003) Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res* **311**:393-9.
- Oikarinen, A.I., Vuorio, E.I., Zaragoza, E.J., Palotie, A., Chu, M.L. and Uitto, J. (1988) Modulation of collagen metabolism by glucocorticoids. Receptor-mediated effects of dexamethasone on collagen biosynthesis in chick embryo fibroblasts and chondrocytes. *Biochem Pharmacol* **37**:1451-62.
- Orii, F., Ashida, T., Nomura, M., Maemoto, A., Fujiki, T., Ayabe, T., Imai, S., Saitoh, Y. and Kohgo, Y. (2002) Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun* **296**:1286-94.
- Otterness, I.G., Weiner, E., Swindell, A.C., Zimmerer, R.O., Ionescu, M. and Poole, A.R. (2001) An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis. Relationship of the markers to clinical end-points. *Osteoarthritis Cartilage* **9**:224-31.
- Pelletier, J.P., Mineau, F., Raynauld, J.P., Woessner, J.F., Jr., Gunja-Smith, Z. and Martel-Pelletier, J. (1994) Intraarticular injections with methylprednisolone acetate reduce osteoarthritic lesions in parallel with chondrocyte stromelysin synthesis in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **37**:414-23.

Pelletier, J.P., DiBattista, J.A., Raynauld, J.P., Wilhelm, S. and Martel-Pelletier, J. (1995) The in vivo effects of intraarticular corticosteroid injections on cartilage lesions, stromelysin, interleukin-1, and oncogene protein synthesis in experimental osteoarthritis. *Lab Invest* **72**:578-86.

Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J. and Abramson, S.B. (2001) Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* **44**:1237-47.

Pelletier, J.P. and Martel-Pelletier, J. (2003) Therapeutic targets in osteoarthritis: from today to tomorrow with new imaging technology. *Ann Rheum Dis* **62 Suppl 2**:ii79-82.

Peterfy, C.G. and Genant, H.K. (2001) Magnetic resonance imaging in arthritis. In: *Arthritis and allied conditions* 14th ed. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 118-54.

Peterfy, C.G. (2003) Magnetic resonance imaging. In: *Osteoarthritis* 2nd ed. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 433-51.

Pitsillides, A.A., Will, R.K., Bayliss, M.T. and Edwards, J.C. (1994) Circulating and synovial fluid hyaluronan levels. Effects of intraarticular corticosteroid on the concentration and the rate of turnover. *Arthritis Rheum* **37**:1030-8.

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

Poole, A.R., Webber, C., Reiner, A. and Roughley, P.J. (1989) Studies of a monoclonal antibody to skeletal keratan sulphate. Importance of antibody valency. *Biochem J* **260**:849-56.

Poole, A.R., Ionescu, M., Swan, A. and Dieppe, P.A. (1994) Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest* **94**:25-33.

Poole, A.R. (2001) Cartilage in Health and Disease. In: *Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology* 14th ed. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins. pp 226-84.

Poole, A.R., Kobayashi, M., Yasuda, T., Lavery, S., Mwale, F., Kojima, T., Sakai, T., Wahl, C., El-Maadawy, S., Webb, G., Tchetina, E. and Wu, W. (2002) Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**:ii78-81.

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

Poole, A.R. (2003) Biochemical/immunochemical biomarkers of osteoarthritis: utility for prediction of incident or progressive osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **29**:803-18.

Poole, A.R., Nelson, F., Dahlberg, L., Tchetina, E., Kobayashi, M., Yasuda, T., Laverty, S., Squires, G., Kojima, T., Wu, W. and Billingham, R.C. (2003) Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochem Soc Symp*:115-23.

Price, J.S., Jackson, B., Eastell, R., Wilson, A.M., Russell, R.G., Lanyon, L.E. and Goodship, A.E. (1995) The response of the skeleton to physical training: a biochemical study in horses. *Bone* **17**:221-7.

Radin, E.L. (2001) Structure and function of joints. In: *Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 157-73.

Ratcliffe, A., Shurety, W. and Caterson, B. (1993) The quantitation of a native chondroitin sulfate epitope in synovial fluid lavages and articular cartilage from canine experimental osteoarthritis and disuse atrophy. *Arthritis Rheum* **36**:543-51.

Recklies, A.D., Baillargeon, L. and White, C. (1998) Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **41**:997-1006.

Richardson, D.W. and Dodge, G.R. (2000) Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res* **61**:624-30.

Richardson, D.W. and Dodge, G.R. (2003) Dose-dependent effects of corticosteroids on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. *Inflamm Res* **52**:39-49.

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

Robion, F.C., Doize, B., Boure, L., Marcoux, M., Ionescu, M., Reiner, A., Poole, A.R. and Laverty, S. (2001) Use of synovial fluid markers of cartilage synthesis and turnover to study effects of repeated intra-articular administration of methylprednisolone acetate on articular cartilage in vivo. *J Orthop Res* **19**:250-8.

Roneus, B., Lindblad, A., Lindholm, A. and Jones, B. (1993) Effects of intraarticular corticosteroid and sodium hyaluronate injections on synovial fluid production and synovial fluid content of sodium hyaluronate and proteoglycans in normal equine joints. *Zentralbl Veterinarmed A* **40**:10-6.

Rosenberg, K., Olsson, H., Morgelin, M. and Heinegard, D. (1998) Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem* **273**:20397-403.

Saari, H., Tulamo, R.M., Konttinen, Y.T. and Sorsa, T. (1992) Methylprednisolone acetate induced release of cartilage proteoglycans: determination by high performance liquid chromatography. *Ann Rheum Dis* **51**:214-9.

Saklatvala, J. (2002) Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res* **4**:146-50.

Sandell, L.J., Morris, N., Robbins, J.R. and Goldring, M.B. (1991) Alternatively spliced type II procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J Cell Biol* **114**:1307-19.

Sandler, E.A., Frisbie, D.D. and McIlwraith, C.W. (2004) A dose titration of triamcinolone acetonide on insulin-like growth factor-1 and interleukin-1-conditioned equine cartilage explants. *Equine Vet J* **36**:58-63.

Saxne, T., Heinegard, D., Wollheim, F.A. and Pettersson, H. (1985) Difference in cartilage proteoglycan level in synovial fluid in early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Lancet* **2**:127-8.

Saxne, T. and Heinegard, D. (1992) Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol* **31**:583-91.

Schurman, D.J. and Smith, R.L. (2004) Osteoarthritis: current treatment and future prospects for surgical, medical, and biologic intervention. *Clin Orthop*:S183-9.

Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E.H., LaBorde, J., Sheehan, D.M., Derynck, R. and Moses, H.L. (1997) Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol* **139**:541-52.

Sharma, H. (2001) Osteoarthritis: a review. *J Indian Med Assoc* **99**:322-4.

Shinmei, M., Miyauchi, S., Machida, A. and Miyazaki, K. (1992) Quantitation of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in pathologic joint fluid. *Arthritis Rheum* **35**:1304-8.

Shlopov, B.V., Lie, W.R., Mainardi, C.L., Cole, A.A., Chubinskaya, S. and Hasty, K.A. (1997) Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* **40**:2065-74.

Shoemaker, R.S., Bertone, A.L., Martin, G.S., McIlwraith, C.W., Roberts, E.D., Pechman, R. and Kearney, M.T. (1992) Effects of intra-articular administration of methylprednisolone acetate on normal articular cartilage and on healing of experimentally induced osteochondral defects in horses. *Am J Vet Res* **53**:1446-53.

Simkin, P.A. (1998) The musculoskeletal system. In: *Rheumatology* 2nd ed. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 1.9.2-1.9.12.

Simkin, P.A. (2001) Synovial physiology. In: *Arthritis and allied conditions - A textbook of Rheumatology*. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp 174-86.

Simkin, P.A. (2003) Synovial physiology in the context of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis* 2nd ed. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 155-61.

Skioldebrand, E., Heinegard, D., Eloranta, M.L., Nilsson, G., Dudhia, J., Sandgren, B. and Ekman, S. (2005) Enhanced concentration of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) in osteochondral fractures from racing Thoroughbreds. *J Orthop Res* **23**:156-63.

Sousa, A.R., Lane, S.J., Cidlowski, J.A., Staynov, D.Z. and Lee, T.H. (2000) Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol* **105**:943-50.

Spriet, M.P., Girard, C.A., Foster, S.F., Harasiewicz, K., Holdsworth, D.W. and Laverty, S. (2005) Validation of a 40MHz B-scan ultrasound biomicroscope for the evaluation of osteoarthritis lesions in an animal model. *Osteoarthritis Cartilage* **13**:171-9.

Squires, G.R., Okouneff, S., Ionescu, M. and Poole, A.R. (2003) The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **48**:1261-70.

Srinivas, G.R., Chichester, C.O., Barrach, H.J. and Matoney, A.L. (1994) Effects of certain antiarthritic agents on the synthesis of type II collagen and glycosaminoglycans in rat chondrosarcoma cultures. *Agents Actions* **41**:193-9.

St Clair, E.W., van der Heijde, D.M., Smolen, J.S., Maini, R.N., Bathon, J.M., Emery, P., Keystone, E., Schiff, M., Kalden, J.R., Wang, B., Dewoody, K., Weiss, R. and Baker, D. (2004) Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* **50**:3432-43.

Steinberg, J.J. and Sledge, C.B. (1991) Chondrocyte mediated cartilage degradation: regulation by prostaglandin E2, cyclic AMP and interferon alpha. *J Rheumatol Suppl* **27**:63-5.

Stoop, R., van der Kraan, P.M., Buma, P., Hollander, A.P., Poole, A.R. and van den Berg, W.B. (1999) Denaturation of type II collagen in articular cartilage in experimental murine arthritis. Evidence for collagen degradation in both reversible and irreversible cartilage damage. *J Pathol* **188**:329-37.

Stricker, S.J., Lozman, P.R., Makowski, A.L. and Gunja-Smith, Z. (1996) Chondroprotective effect of betamethasone in lapine pyogenic arthritis. *J Pediatr Orthop* **16**:231-6.

Sweet, M.B., Coelho, A., Schnitzler, C.M., Schnitzer, T.J., Lenz, M.E., Jakim, I., Kuettner, K.E. and Thonar, E.J. (1988) Serum keratan sulfate levels in osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 31:648-52.

Thonar, E.J., Lenz, M.E., Klintworth, G.K., Caterson, B., Pachman, L.M., Glickman, P., Katz, R., Huff, J. and Kuettner, K.E. (1985) Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum* 28:1367-76.

Thonar, E.J. and Manicourt, D.H. (2001) Noninvasive Markers in Osteoarthritis. In: *Osteoarthritis. Diagnosis and Medical/Surgical Management*. Moskowitz, Howell, Altman, Buckwalter and Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA. pp 293-313.

Tobetto, K., Nakai, K., Akatsuka, M., Yasui, T., Ando, T. and Hirano, S. (1993) Inhibitory effects of hyaluronan on neutrophil-mediated cartilage degradation. *Connect Tissue Res* 29:181-90.

Todhunter, R.J., Yeager, A.E., Freeman, K.P., Parente, E.J. and Lust, G. (1993) Keratan sulfate as a marker of articular cartilage catabolism and joint treatment in ponies. *Am J Vet Res* 54:1007-16.

Todhunter, R.J., Fubini, S.L., Wootton, J.A. and Lust, G. (1996) Effect of methylprednisolone acetate on proteoglycan and collagen metabolism of articular cartilage explants. *J Rheumatol* 23:1207-13.

Todhunter, R.J., Fubini, S.L., Vernier-Singer, M., Wootton, J.A., Lust, G., Freeman, K.P. and MacLeod, J.N. (1998) Acute synovitis and intra-articular methylprednisolone acetate in ponies. *Osteoarthritis Cartilage* 6:94-105.

Tortorella, M.D., Malfait, A.M., Deccico, C. and Arner, E. (2001) The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 9:539-52.

Trotter, G.W., McIlwraith, C.W., Yovich, J.V., Norrdin, R.W., Wrigley, R.H. and Lamar, C.H. (1991) Effects of intra-articular administration of methylprednisolone acetate on normal equine articular cartilage. *Am J Vet Res* 52:83-7.

Trotter, G.W. (1996) Intra-articular corticosteroids. In: *Joint disease in the Horse*. CW McIlwraith and GW Trotter, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA. pp 237-56.

Tulamo, R.M. (1991) Comparison of high-performance liquid chromatography with a radiometric assay for determination of the effect of intra-articular administration of corticosteroid and saline solution on synovial fluid hyaluronate concentration in horses. *Am J Vet Res* 52:1940-4.

Tung, J.T., Venta, P.J., Eberhart, S.W., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Alexander, L. and Caron, J.P. (2002) Effects of anti-arthritis preparations on gene expression and enzyme activity of cyclooxygenase-2 in cultured equine chondrocytes. *Am J Vet Res* 63:1134-9.

Van Beuningen, H.M., Glansbeek, H.L., van der Kraan, P.M. and van den Berg, W.B. (2000) Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections. *Osteoarthritis Cartilage* **8**:25-33.

Vankemmelbeke, M., Dekeyser, P.M., Hollander, A.P., Buttle, D.J. and Demeester, J. (1998) Characterization of helical cleavages in type II collagen generated by matrixins. *Biochem J* **330 (Pt 2)**:633-40.

Verdier, M.P., Seite, S., Guntzer, K., Pujol, J.P. and Boumediene, K. (2003) Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int.*

Verschure, P.J., van der Kraan, P.M., Vitters, E.L. and van den Berg, W.B. (1994) Stimulation of proteoglycan synthesis by triamcinolone acetonide and insulin-like growth factor 1 in normal and arthritic murine articular cartilage. *J Rheumatol* **21**:920-6.

Vervuert, I., Coenen, M., Wedemeyer, U. and Harmeyer, J. (2002) Biochemical markers of bone activity in young standardbred horses during different types of exercise and training. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **49**:396-402.

Webster, J.C., Oakley, R.H., Jewell, C.M. and Cidlowski, J.A. (2001) Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6865-70.

Williams, J.M. and Brandt, K.D. (1985) Triamcinolone hexacetonide protects against fibrillation and osteophyte formation following chemically induced articular cartilage damage. *Arthritis Rheum* **28**:1267-74.

Wu, C.W., Tchetina, E.V., Mwale, F., Hasty, K., Pidoux, I., Reiner, A., Chen, J., Van Wart, H.E. and Poole, A.R. (2002) Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J Bone Miner Res* **17**:639-51.

Yasui, T., Akatsuka, M., Tobetto, K., Hayaishi, M. and Ando, T. (1992) The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions* **37**:155-6.

Young, L., Katrib, A., Cuello, C., Vollmer-Conna, U., Bertouch, J.V., Roberts-Thomson, P.J., Ahern, M.J., Smith, M.D. and Youssef, P.P. (2001) Effects of intraarticular glucocorticoids on macrophage infiltration and mediators of joint damage in osteoarthritis synovial membranes: findings in a double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* **44**:343-50.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant CELESTE Christophe		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences Cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs CELESTE C., IONESCU M., POOLE A.R., LAVERTY S.	
Titre Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetone alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid	
Revue Journal of Orthopaedic Research	Date de publication Sous presse

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christophe Céleste inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Étude des effets d'injections intraarticulaires répétées d'acétonide de triamcinolone sur le métabolisme cartilagineux chez le cheval</i>		
Coauteur Mirela Ionescu	Signature	Date
Coauteur Robin A. Poole	Signature	Date
Coauteur [REDACTED]	Signature [REDACTED]	Date 31/3/2005
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant CELESTE Christophe		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences Cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs CELESTE C., IONESCU M., POOLE A.R., LAVERTY S.	
Titre Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid	
Revue Journal of Orthopaedic Research	Date de publication Sous presse

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christophe Céleste inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude des effets d'injections intraarticulaires répétées d'acétonide de triamcinolone sur le métabolisme cartilagineux chez le cheval</i>		
Coauteur Mirela Ionescu	Signature [REDACTED]	Date 22.03.05
Coauteur Robin A. Poole	Signature	Date
Coauteur Sheila Laverty	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant CELESTE Christophe		Code permanent [REDACTED]
Signe du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences Cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs CELESTE C., IONESCU M., POOLE A.R., LAVERTY S.	
Titre Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid	
Revue Journal of Orthopaedic Research	Date de publication Sous presse

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christophe Céleste inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Étude des effets d'injections intraarticulaires répétées d'acétonide de triamcinolone sur le métabolisme cartilagineux chez le cheval</i>		
Coauteur Mirela Ionescu	Signature [REDACTED]	Date [REDACTED]
Coauteur Robin A. Poole	Signature [REDACTED]	Date March 17 2005
Coauteur Sheila Laverty	Signature [REDACTED]	Date [REDACTED]
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FRS le

PERMISSION DE L'ÉDITEUR D'UNE REVUE OU D'UN LIVRE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant CELESTE Christophe		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences Cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs CELESTE C., IONESCU M., POOLE A.R., LAVERTY S.		
Titre Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetone alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid		
Numéro de la revue	Pages	Date

IDENTIFICATION DE LA REVUE OU DU LIVRE

Nom complet de la revue Journal of Orthopaedic Research		Date
Adresse Dept. Of Orthopaedic Surgery, The University of Iowa Hospitals and Clinics 200 Hawkins Drive, Iowa City, IA, 52242-1088, USA		

DECLARATION DE L'ÉDITEUR

Nom complet de l'éditeur Joseph A. BUCKWALTER, M.D. Co-Editor-In-Chief	
Déclaration <i>À titre d'éditeur, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christophe Céleste inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Étude des effets d'injections intraarticulaires répétées d'acétonide de triamcinolone sur le métabolisme cartilagineux chez le cheval.</i>	
Éditeur Joseph A. BUCKWALTER	Date 4/5/05
Envoyé à la FÉS le	

