

Université de Montréal

# **Dégradation du collagène dans le cartilage équin par la cathepsine K**

par Beatriz Noé

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Août 2016

© Beatriz Noé, 2016

## Résumé

Le collagène de type II, qui confère au cartilage articulaire sa résistance à la tension, est détruit dans l'arthrose. La cathepsine K est reconnue comme pouvant cliver le collagène de type II. Cependant, la régulation de son activité dans le cartilage est peu connue. Notre hypothèse est que l'activité de la cathepsine K dans le cartilage est mesurable par une ELISA spécifique au site de clivage de la cathepsine K. Une nouvelle ELISA spécifique (C2K77) a été développée et testée en mesurant l'activité de la cathepsine K exogène. L'ELISA C2K77 a ensuite été utilisée pour mesurer l'activité de la cathepsine K endogène dans des explants de cartilage articulaire équin mis en culture avec ou sans stimulations (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , oncostatine M (OSM) et le LPS). Puis l'activité de la cathepsine K a été comparée à celle des MMPs (avec l'ELISA C1,2C) dans les explants de cartilage et dans le cartilage fraîchement récolté. Une différence significative a été observée entre le cartilage normal et le cartilage digéré avec la cathepsine K exogène ( $p < 0.01$ ). Il n'y avait aucune différence significative dans la quantité de C2K77 entre le groupe control et les groupes stimulés tandis que la quantité de C1,2C a été augmenté par la combinaison de l'IL-1 $\beta$  et de l'OSM ( $p = 0.002$ ) et du TNF- $\alpha$  et de l'OSM ( $p < 0.0001$ ). La nouvelle ELISA C2K77 démontre la capacité de mesurer l'activité de la cathepsine K et a permis de voir qu'il y a une différence entre la régulation de la cathepsine K et des MMPs.

**Mots-clés :** cathepsine K, collagène de type II, MMPs, ELISA, OA, cartilage, cytokines, équin

## **Abstract**

Type II collagen, which gives the cartilage its tensile strength, is destroyed in osteoarthritis (OA). Cathepsin K is recognized as capable of cleaving type II collagen, however, the regulation of its activity in the cartilage is little known. Our hypothesis is that the activity of cathepsin K in cartilage is measured by an ELISA specific to cathepsin K cleavage site. A new specific ELISA (C2K77) was developed and tested by measuring the activity of the exogenous cathepsin K. The ELISA C2K77 was then used to measure the activity of the endogenous cathepsin K in equine articular cartilage explants cultured with or without stimulation (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Oncostatin M (OSM) and LPS). Then the activity of cathepsin K was compared to that of MMPs (C1,2C ELISA) in the cartilage explants and in the freshly harvested cartilage. A significant difference was observed between normal cartilage and cartilage digested with cathepsin K ( $p < 0.01$ ). There was no significant difference in the content of C2K77 between the control group and the groups stimulated while the content of C1,2C was increased by the combination of IL-1 $\beta$  and OSM ( $p = 0.002$ ) and TNF- $\alpha$  and OSM ( $p < 0.0001$ ). The new ELISA C2K77 demonstrates the ability to measure the activity of cathepsin K and revealed that there is a difference between the regulation of cathepsin K and MMP in articular cartilage.

**Keywords** : cathepsin K, type II collagen, MMPs, ELISA, Osteoarthritis, cartilage, cytokines, equine

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures .....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	vii
Remerciements.....	ix
1. Introduction.....	1
2. Recension des écrits .....	3
2.1. Articulation saine .....	3
2.1.1. Organisation du cartilage articulaire.....	5
2.2. Arthrose.....	7
2.2.1. Causes .....	8
2.2.2. Pathophysiologie.....	9
2.2.3. Caractéristique des tissus articulaire avec arthrose.....	11
2.2.4. Lésions microscopiques du cartilage .....	14
2.3. Métalloprotéases matricielles.....	15
2.4. Cathepsine K.....	17
2.4.1. Structure moléculaire .....	17
2.4.2. Régulation génique .....	19
2.4.3. Sites de clivage de la cathepsine K sur le collagène et l'agrécan .....	21
2.4.4. Emplacement.....	23
2.4.5. Inhibiteurs .....	25
2.5. Biomarqueurs.....	27
2.5.1. Activité des MMPs sur collagène II: biomarqueur spécifique de dégradation cartilagineuse .....	28

2.5.2. Activité de la cathepsine K sur collagène I: biomarqueur spécifique de dégradation osseuse .....	29
2.5.3. Activité de la Cathepsine K sur collagène II: biomarqueur spécifique de dégradation cartilagineuse.....	29
2.6. ELISA .....	30
2.6.1. Les différentes méthodes d'ELISA.....	30
2.6.2. L'utilité de L'ELISA.....	31
3. Hypothèse et objectifs.....	32
4. Article .....	33
Introduction.....	33
Methods.....	35
Results.....	38
Discussion .....	44
Supplementary information for online (to accompany manuscript).....	49
5. Discussion générale .....	54
Conclusion .....	60
Bibliographie.....	i

## Liste des tableaux

Tableau I. MMPs, leur nom alternatif et les cellules qui les produisent .....	15
Tableau II. Details of specimens employed in cathepsin K digestion, in cartilage explant and in $\alpha$ -chymotrypsin digestion of fresh and OA cartilage study.....	38

## Liste des figures

Figure 1.	Articulation saine .....	5
Figure 2.	Structure du cartilage articulaire .....	7
Figure 3.	Pathophysiologie de l'OA .....	11
Figure 4.	Cartilage normal et ayant l'arthrose.....	13
Figure 5.	Structure tridimensionnelle de la cathepsine K. Le domaine L se situe à gauche et le domaine D, à droite.....	18
Figure 6.	Exemple de poches présentes dans une protéase .....	19
Figure 7.	Clivage du collagène de type II par la cathepsine K et les collagénases .....	22
Figure 8.	Site de clivage de la cathepsine K sur l'agrécan.....	23
Figure 9.	ELISA d'inhibition compétitive .....	31
Figure 10.	Standard curve of the ELISA C2K77 assay.....	39
Figure 11.	Equine articular cartilage digested with and without cathepsin K.....	40
Figure 12.	In situ depletion of proteoglycan and cleavage of type II collagen by cathepsin K . .....	41
Figure 13.	Influence of cytokines and LPS on cleavage by cathepsin K in cultured healthy equine cartilage explants compared to endogenous non-stimulated cathepsin K type II collagen cleavage in OA explants: detection of cathepsin K (C2K77) and matrix metalloproteinase (MMP) collagenase (C1,2C) activity with ELISA .....	42
Figure 14.	Comparison of cathepsin K (C2K77) and MMP collagenase (C1,2C) activity in freshly isolated normal and OA articular cartilages .....	43

## Liste des sigles et abréviations

ADAMTs: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (métalloprotéases contenant un domaine désintégrine et des motifs thrombospondines)

AH: acide hyaluronique

ARNm: ARN messenger

Asp: asparagine

BSA: bovine serum albumin (albumine du sérum de bovin)

COMP: cartilage oligomeric matrix protein (protéine matricielle oligomérique du cartilage)

C-terminale: carboxy-terminale

CTX-I: le telopeptide C-terminal du collagène de type I

CTX-II: le telopeptide C-terminal du collagène de type II

His: histidine

HRP: horseradish peroxydase

IL-1 $\beta$ : interleukine-1 beta

LPS: lipopolysaccharide

MEC: matrice extracellulaire

MMP: matrix metalloproteinases (métalloprotéases matricielles)

N-terminale: amine-terminale

OA: osteoarthritis (arthrose)

OP-1: osteogenic protein-1 (protéine ostéogénique -1)

OPG: osteoprotegerin (ostéoprotégérine)

OSM: oncostatine M

PBS: phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)

Pro: proline

RANK: receptor activator of nuclear factor kappa-B (récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B)

RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B)

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)

Tyr: tyrosine



VEGF: vascular endothelial growth factor (facteur de croissance endothélial)

## Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dre Sheila Laverty, de m'avoir permis de travailler sur un projet intéressant et de m'avoir appris le « multitasking ». Malgré qu'elle fût très occupée en clinique, elle trouvait toujours le temps de prendre de nos nouvelles. Cela est très apprécié.

J'aimerais remercier Hélène Richard, qui m'a appris toutes les manipulations que j'ai eu à faire au cours de ma maîtrise. Lorsque Dre Laverty était en clinique, c'était Hélène qui « prenais en charge » le labo. Hélène s'est souvent portée volontaire pour m'aider lorsque j'avais des difficultés dans mes manipulations et elle m'a beaucoup aidé à améliorer mes figures.

J'aimerais remercier Dr Robin A. Poole et Dr John S. Mort pour leurs conseils et leur aide pour le développement de l'ELISA et pour la rédaction de l'article. Leur expertise dans le domaine de la recherche m'a été d'une grande aide.

J'aimerais remercier MITACS et NSERC pour les bourses d'études que j'ai reçues afin de réaliser mon projet de maîtrise.

J'aimerais remercier mes parents pour leur support et leur encouragement. J'aimerais remercier mes sœurs et mes amis qui m'ont souvent fait rire et qui m'ont soutenu en tout temps. Je remercie particulièrement mon confident qui m'a aidé à garder espoir même dans les moments difficiles de mon parcours scolaire.

# 1. Introduction

L'arthrose (OA) est une maladie dégénérative progressive de l'articulation caractérisée par la dégénération et la perte du cartilage articulaire, par le remodelage de l'os sous-chondral, par l'inflammation de la membrane synoviale et par la douleur(1). Plusieurs facteurs peuvent déclencher l'OA incluant les traumatismes, l'usure, le vieillissement, l'obésité(2) ainsi que les facteurs génétiques(3).

Le collagène de type II est le collagène le plus abondant dans matrice extracellulaire du cartilage formant à lui seul 95 % du contenu total en collagène(4). La molécule de collagène de type II est composée de trois chaînes alpha identiques (homotrimère). Le réseau tridimensionnel des fibrilles de collagène de type II procure au cartilage sa résistance à la traction et est essentiel au maintien de la forme et du volume du cartilage(4). Dans l'OA, le réseau formé par la triple hélice du collagène de type II est progressivement dégradé par la digestion enzymatique et sa destruction est un événement clé irréversible dans la dégradation de la matrice cartilagineuse lors de l'OA(5).

La triple hélice du collagène de type II est une structure hautement résistante et peu d'enzymes sont capables d'effectuer le clivage primaire sur l'hélice lorsqu'il est intact. Suite au clivage primaire, la molécule se déroule et devient susceptible à des clivages supplémentaires par les enzymes présentes dans la matrice extracellulaire. Le clivage primaire est une étape clé initiale de la voie menant à la dégradation et à la perte du cartilage dans l'OA.

Les collagénases faisant partie de la famille des métalloprotéases matricielles (MMPs) sont considérées comme étant des enzymes importantes impliquées dans le clivage primaire du collagène de type II dans l'OA(6). Les MMPs 1, 8 et 13 clivent le collagène de type II près de l'extrémité carboxy (C) -terminale permettant une dégradation plus approfondie par les autres collagénases. Cependant, le principal responsable de la dégradation du collagène de type II dans l'OA est le MMP13(7). Par contre, une autre enzyme, la cathepsine K, pourrait jouer un rôle important dans la dégradation du cartilage dans l'OA.

La cathepsine K a la capacité de cliver le collagène de type II, et ce, à plusieurs sites(8). La cathepsine K, un membre de la famille des protéines ressemblantes à la papaïne, est une cystéine protéase qui dégrade plusieurs molécules de la matrice extracellulaire incluant les protéoglycanes et le collagène de type I et II. Cette endopeptidase a été originellement

trouvée dans les ostéoclastes ayant un rôle important dans la résorption osseuse(9). Maintenant, il est connu qu'elle est également présente dans les chondrocytes(10). Contrairement aux MMPs, la cathepsine K dégrade le collagène de type II en coupant la molécule près de l'extrémité amine (N)-terminal puis à une variété de sites dans toute la molécule(11). Des études immunohistochimique ont révélé une grande quantité de cathepsine K et de ses produits de dégradation, venant du collagène de type II clivé, à côté des chondrocytes dans l'OA suggérant qu'elle joue un rôle dans la dégradation de la matrice dans la maladie articulaire équine(10) et humaine(5).

La stimulation de l'activité des collagénases impliquée dans la dégradation du collagène de type II dans l'OA a été bien étudiée(12-14). Cependant, on connaît peu sur la régulation de la cathepsine K. Une telle connaissance sur l'activité de la cathepsine K aiderait à mieux comprendre son rôle dans la pathologie, incluant l'OA, et pourrait potentiellement mener au développement d'un biomarqueur pour l'OA.

Des sites de clivage de la cathepsine K, spécifiques aux collagènes de type II équin, ont été récemment identifiés et un anticorps contre un des sites de clivages (C2K77) a été produit dans le lapin(11). L'immunocoloration des sections de cartilage ayant l'OA a révélé la capacité de l'anticorps à détecter le clivage de la cathepsine K dans le cartilage ayant l'OA(11) suggérant que cet anticorps pourrait être un candidat potentiel pour un dosage immunologique ELISA.

## **2. Recension des écrits**

### **2.1. Articulation saine**

Le corps, humain ou animal, est composé de plusieurs organes et appareils qui permettent son bon fonctionnement. L'appareil locomoteur fait partie de plusieurs systèmes retrouvés dans le corps. L'appareil locomoteur aide à la locomotion et par conséquent fait appel aux trois grandes branches de l'anatomie qui sont l'ostéologie, la myologie et l'arthrologie. Arthrologie se définit comme étant l'étude des articulations(15). Les articulations sont des structures plus ou moins mobiles reliant les os et assurant la mobilité ainsi que la solidité du squelette(16). Il y a trois grandes familles d'articulations que l'on retrouve dans le corps : les articulations fibreuses, les articulations cartilagineuses et les articulations synoviales(17). Les articulations fibreuses sont dépourvues de cartilage, sont presque toutes immobiles et sont principalement trouvées au niveau de la structure crânienne(16). Les articulations cartilagineuses permettent un mouvement limité et les os sont reliés entre eux par du cartilage. Les synchondroses de la colonne vertébrale en sont un bon exemple. Les articulations synoviales possèdent une cavité remplie de liquide et sont caractérisées par une surface complètement recouverte de cartilage. L'articulation du genou est un exemple de cette catégorie(15). Cette dernière classe d'articulation est celle qui a fait l'objet de mon projet et ce sont de ses composantes dont il sera question dans les lignes qui suivent.

Les articulations synoviales possèdent cinq principales composantes qui sont la membrane synoviale, le liquide synovial, le cartilage articulaire, l'os sous-chondral et les ligaments (Fig. 1). Certaines articulations comme celles du genou par exemple possèdent également des ménisques(18).

En premier lieu, on retrouve la membrane synoviale qui constitue la partie interne de la capsule articulaire. Elle possède deux couches distinctes. La première couche est une couche externe stromale du côté de la capsule articulaire. Elle est composée de tissu adipeux et fibreux dont le collagène, les protéoglycanes ainsi que l'acide hyaluronique (AH). Cette couche externe est également bien vascularisée et innervée(18). On y retrouve certaines cellules comme des fibroblastes, des macrophages, des lymphocytes ainsi que des mastocytes(19). La

deuxième couche est une couche interne cellulaire donnant sur le liquide synovial. On y retrouve les trois types de synoviocytes (type A, B et C). Contrairement aux cellules épithéliales, les synoviocytes ne possèdent pas de membrane basale ce qui permet beaucoup d'échanges entre les vaisseaux dans la couche externe et le liquide synovial(20).

Puis vient le liquide synovial qui est un fluide visqueux d'apparence jaunâtre et pâle retrouvé dans la cavité de l'articulation. Il est composé de l'ultrafiltrat du plasma sanguin dans lequel des glycoprotéines et de l'AH ont été ajoutés. Ce fluide a pour rôle de lubrifier l'articulation et de nourrir les cellules présentes dans les couches supérieures du cartilage(18). Il est normalement acellulaire avec un décompte d'environ 50 à 100 cellules par millilitre(19). Le liquide synovial est utile lors d'analyse concernant l'état de l'articulation, car plusieurs produits de dégradation, de cellules, de protéases, de molécules inflammatoires peuvent y être présents en cas de pathologie(21).

La prochaine composante de l'articulation est l'os sous-chondral qui fait référence ici à la portion de l'os qui est directement sous le cartilage calcifié. On y retrouve la plaque osseuse sous-chondrale qui est une mince couche d'os compacte. Cette mince couche osseuse est suivie de l'os spongieux (ou trabéculaire) d'où viennent les vaisseaux sanguins qui vont jusqu'à la plaque osseuse sous-chondrale. Cette vascularisation apporte 50 % de l'apport en oxygène et en glucose dont le cartilage a besoin(22).

En dernier lieu, on retrouve les ligaments qui aident à stabiliser les structures de l'articulation et à prévenir les mouvements excessifs. Ils sont faits de collagènes denses, très rapprochés et alignés dans la même direction(23).

Le cartilage articulaire, étant la structure la plus étudiée au cours de ma maîtrise, sera discuté dans la section suivante.

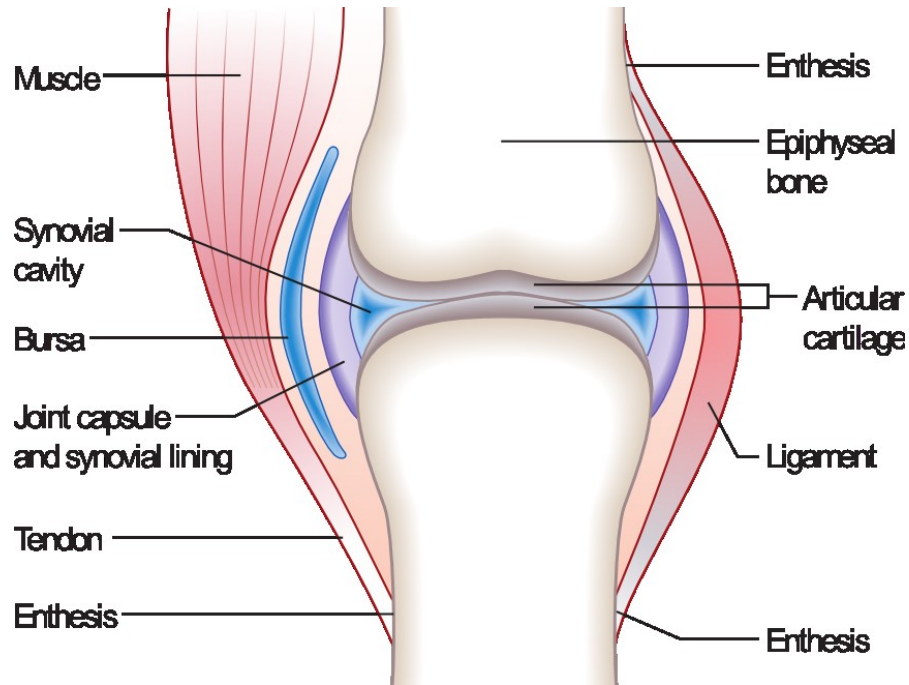


Figure 1. Articulation saine(24)

### 2.1.1. Organisation du cartilage artulaire

Le cartilage artulaire est un tissu conjonctif spécialisé qui a pour rôle de faciliter la transmission de la charge avec une faible friction et qui fournit une surface lisse et lubrifiée pour l'articulation(25). On n'y retrouve normalement pas d'innervation, ni de vascularisation. La nutrition des cellules est faite par diffusion à partir de l'os sous-chondral (pour les couches profondes) ou du liquide synovial (pour les couches supérieures)(4). Dans une articulation adulte normal, le cartilage est translucide, lisse et brillant(4).

#### 2.1.1.1 Cellules

Les chondrocytes sont les cellules retrouvées dans le cartilage artulaire adulte et proviennent de la différenciation des chondroblastes qui sont initialement responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) lors du développement(26). Les chondrocytes, quant à eux, maintiennent l'homéostasie du cartilage, c'est-à-dire l'équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation des composantes de la MEC(4). Ils constituent seulement 2 % du cartilage artulaire normal de l'adulte(27). Ils se trouvent dans des espaces du cartilage

appelées *lacunes* et ont un faible contact intercellulaire(27). Étant donné que l'environnement du cartilage articulaire est hypoxique, les chondrocytes sont principalement anaérobiques(27). Ils varient en taille, en forme et en nombre tout dépendamment de la région anatomique où ils se trouvent dans le cartilage articulaire(25).

#### 2.1.1.2 Composition de la matrice extracellulaire

La MEC est composée d'eau (65-80 %) et de macromolécules (25-30 %), dont les protéoglycanes et les différents types de collagènes. Parmi les protéoglycanes on retrouve l'agrécan, qui constitue la majorité des protéoglycanes(28), la décorine, la biglycane et la fibromoduline(4). Les protéoglycanes s'attachent, par leur domaine globulaire, à l'AH et leur capacité d'agrégation à l'AH permet de les classer(4).

La MEC du cartilage possède plusieurs types de collagène. On dénombre le collagène de type II, IV, IX et XI, mais c'est le collagène de type II qui prédomine représentant 95 % du collagène présent(4). Le cartilage articulaire possède quatre zones qui se distinguent par la position des chondrocytes, des molécules de collagènes ainsi que des protéoglycanes (Fig. 2). Dans la première zone, appelée zone superficielle, on retrouve des chondrocytes aplatis et des fibres de collagène de type II disposées parallèlement à la surface articulaire(4). Au-dessus de la première zone, on retrouve une couche acellulaire nommée *lamina splendens* qui permet l'accrochage de certaines macromolécules présentes dans le liquide synovial(4). La deuxième zone, appelée zone de transition, est la plus large du cartilage articulaire (40-60 %). On y retrouve du collagène de type II disposé obliquement et aléatoirement. Les chondrocytes sont arrondis et il y a une grande quantité de protéoglycanes(29). La troisième zone, la zone profonde, est caractérisée par des chondrocytes et des fibres de collagène de type II alignées perpendiculairement à la surface articulaire. La quatrième et dernière zone est le cartilage calcifié. C'est la zone de transition entre le cartilage et l'os. On y retrouve du collagène de type X. Entre la troisième et la quatrième zone, on retrouve le "tidemark" qui est une ligne basophile séparant le cartilage non calcifié du cartilage calcifié(29).



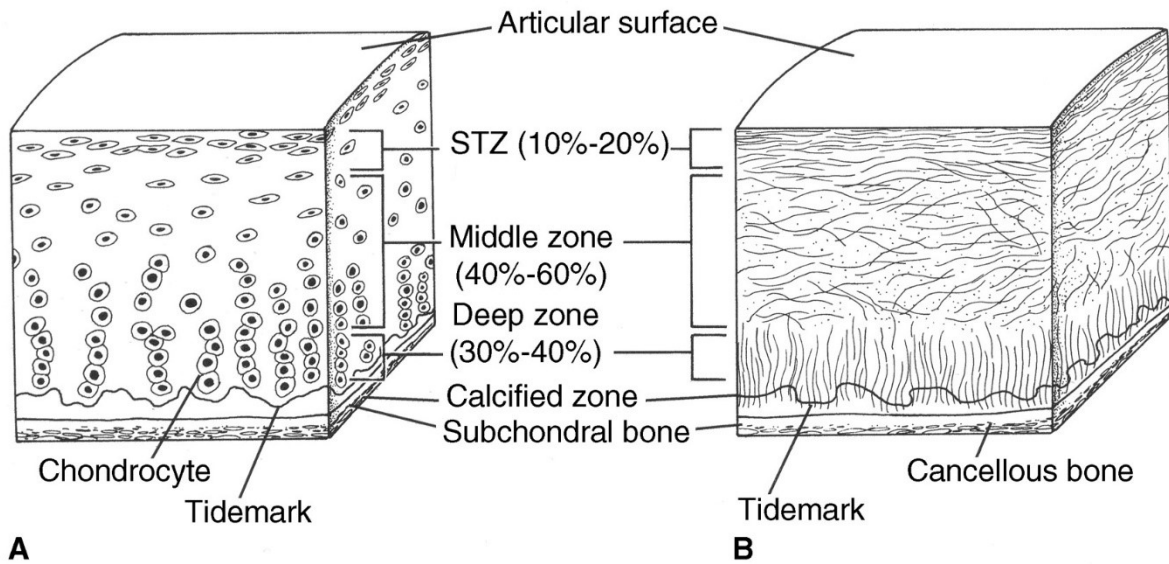


Figure 2. Structure du cartilage articulaire(30)

## 2.2. Arthrose

L'Arthrose (OA) est une maladie dégénérative progressive de l'articulation(31) causant de la douleur(32). La principale caractéristique de cette pathologie est la dégénération progressive du cartilage articulaire. Cependant, on observe aussi l'altération de l'os sous-chondral, où on y retrouve de la sclérose et de l'œdème, et de l'inflammation légère à modérée au niveau de la membrane synoviale(1, 33). Dans certaines articulations comme celle du genou par exemple, on observe également des lésions au niveau des ménisques(34). Comme le mentionnent Yuan et al(1) cette pathologie n'est pas uniquement un problème d'usure, mais plutôt un problème de remodelage anormal et de la défaillance de l'articulation. Cette pathologie articulaire est une préoccupation majeure parce qu'elle touche un grand nombre de personnes et parce qu'elle peut avoir un impact sur la qualité de vie. Elle représente également un coût élevé pour le système de santé(31). L'OA est aussi présente chez plusieurs espèces comme le cheval où l'on observe une boiterie chez l'animal atteint(31). Cette pathologie occasionne également des pertes au niveau économique dans le milieu équin étant donné qu'elle prive les chevaux de leur capacité à bien performer(31).

### 2.2.1. Causes

Plusieurs facteurs peuvent occasionner l'OA. Cependant, la séquence exacte du déclenchement de la pathologie n'est pas connue(2). On rapporte que 12 % des cas d'OA sont causés par les blessures post-traumatiques. Les fractures intra-articulaires et des traumatismes méniscaux, ligamenteux ou chondraux sont les principales blessures qui mènent à l'OA(35). Suite au traumatisme, on retrouve la phase immédiate (où le cartilage est enflé et il y a la rupture du collagène), la phase aigüe (où il y a de l'apoptose, de la libération des médiateurs de l'inflammation, de la dégradation de la MEC) et la phase chronique qui mène à l'OA(35).

Il est connu qu'avec l'avancement de l'âge, le corps perd sa capacité à maintenir l'homéostasie et sa capacité à faire face au stress(36). Une étude a démontré que les personnes âgées développent l'OA plus rapidement suite à une blessure à l'articulation que les jeunes adultes(37) montrant une diminution des mécanismes qui maintiennent l'homéostasie. Ceci amène une réponse inadéquate face à la charge anormale et aux blessures à l'articulation(36). Avec l'âge, on observe chez les chondrocytes une augmentation de la sécrétion de certaines enzymes protéolytiques(38) et une diminution de l'expression de certains facteurs de croissance comme la protéine ostéogénique 1 (OP-1)(39). Tout ceci a pour conséquence une augmentation de l'activité catabolique et une diminution de l'activité anabolique(36).

L'obésité est également un facteur qui peut provoquer l'OA. En effet, les adipokines libérés par les cellules adipeuses peuvent affecter les processus présents dans l'articulation en augmentant, entre autres, la réponse à l'inflammation(33, 40). Un autre facteur qui peut mener à l'OA est le vieillissement.

Les facteurs génétiques sont également à considérer pour l'OA. L'influence de la génétique dans l'OA radiographique est estimée entre 39-65 %(41). Il faut également noter que des altérations dans plusieurs gènes, surtout ceux codant pour la MEC comme le collagène de type II, peuvent influencer la susceptibilité génétique à l'OA(42).

Chez le cheval l'OA est parfois secondaire à trauma unique ou plus souvent répétitif relié au sport athlétique du cheval. L'articulation ayant des blessures traumatiques peut soit développer une inflammation de la membrane synoviale ou peut avoir directement des dommages au cartilage et à l'os. L'un ou l'autre des scénarios peut mener au développement

de l'OA(43). Cependant, la synovite aiguë et la capsulite sont les problèmes le plus communs chez les équins et conduisent le plus souvent vers l'OA post-traumatique(43).

### **2.2.2. Pathophysiologie**

Plusieurs molécules favorisent le déclenchement ou l'aggravation de l'Arthrose. La plupart du temps, ces molécules agissent sur plusieurs cellules retrouvées dans l'articulation. On ne connaît pas vraiment ce qui déclenche l'OA, cependant, Scanzello et al(44) démontrent que des fragments du cartilage articulaire peuvent déclencher le système immunitaire inné dans l'OA causant une inflammation de la membrane synoviale. La membrane synoviale à son tour peut libérer des molécules pro-inflammatoires(2), des médiateurs inflammatoires et des neuropeptides(45). La membrane synoviale produit également du TGF- $\beta$  et de l'IL-6 qui peut diriger les ostéoblastes du mode normal au mode sclérotique(2).

Au niveau du cartilage, les deux cytokines proinflammatoires ayant le plus d'impact sont l'IL-1 $\beta$  et le TNF. Il sera premièrement discuté l'IL-1 $\beta$  qui est associé à la destruction du cartilage. Chez les patients atteints d'OA, le nombre de récepteurs membranaires d'IL-1 $\beta$  augmente à la surface des chondrocytes et des synoviocytes fibroblastiques(46, 47). Cette cytokine pro-inflammatoire agit sur les chondrocytes (Fig. 3) en supprimant l'expression du collagène de type II ainsi que de l'agrécan(48, 49). Chez le rat, son action contre l'expression de l'agrécan serait médiée par la suppression de la  $\beta$ -1,3-glucuronyltransférase I(40). IL-1 $\beta$  semble également diminuer l'expression d'un membre de la famille des métalloprotéases contenant un domaine désintégrine et des motifs thrombospondines (ADAMTs)-5 dans les chondrocytes(21). Le ADAMTs-5 fait partie de la famille des agrécanases qui sont des enzymes pouvant cliver l'agrécan(50). L'IL-1 $\beta$  n'a pas que des effets suppresseurs, elle possède également une activité stimulatrice. En effet, elle augmente la régulation de certaines métalloprotéases matricielles (MMP) telles que la MMP-1, 3 et 13 par les chondrocytes et induit la production d'autres cytokines telles que l'IL-6 et des chemokines tels que l'IL-8, MCP-1 et CCL5(40). La stimulation avec l'IL-1 $\beta$  occasionne aussi le clivage du collagène de type IX par l'intermédiaire du MMP-13(51)et la fragmentation de la COMP qui est responsable de promouvoir la formation de collagène(33). La fragmentation de la COMP cause un déséquilibre qui diminue la capacité de réparation du cartilage(33).

Quant au TNF- $\alpha$  (Fig. 3), associé à la cascade inflammatoire, on le retrouve à des niveaux élevés dans le même emplacement que l'IL-1 $\beta$  soit dans le liquide synovial, dans la membrane synoviale, dans le cartilage et dans l'os sous-chondral. Comme pour l'IL-1 $\beta$ , le récepteur de TNF (TNFRI) est également être augmenté à la surface des chondrocytes et des synoviocytes fibroblastiques(52). Cette cytokine supprime, dans les chondrocytes, la synthèse de protéoglycanes, de protéines de liaison et du collagène de type II(40). Dans le cartilage endommagé on observe la diminution de l'expression de l'ARN messenger (ARNm) de la lubricine(21), glycoprotéine jouant un rôle important dans la lubrification de l'articulation(53), alors que le blocage de TNF- $\alpha$  augmente la liaison de la lubricine au cartilage(21). Ceci laisserait entendre que le TNF- $\alpha$  diminue l'adhérence de la lubricine au cartilage. Le TNF- $\alpha$  augmente la régulation des mêmes MMPs que l'IL-1 $\beta$  et de certaines cytokines telles que l'IL-6 et IL-8(40).

Mis à part l'IL-1 $\beta$  et le TNF-  $\alpha$ , il y a d'autres molécules pro-inflammatoires qui entrent en jeu dans l'OA. Il y a l'IL-6, par exemple, qui agit sur le cartilage en diminuant l'expression du collagène de type II(54). L'IL-17, une autre cytokine pro-inflammatoire, déclenche la production de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ainsi que du TNF. Il augmente aussi l'expression du l'oxyde nitrique et des MMPs et diminue les niveaux de protéoglycanes(40). Les chondrocytes libèrent également de la prostaglandine E2(55). Tous ces changements sont apportés par l'activation de plusieurs voies signalétiques comme le c-jun-N-terminal kinase, p38 mitogen-activated kinase, Wnt- $\beta$  catéline et NF $\kappa$ b qui est la plus importante de ces voies(40).

Les ostéoblastes situés sous la plaque osseuse sous-chondrale, en dessous du cartilage ayant été touché l'OA, produisent plus d'IL-6, 8, de TGF-  $\beta$ 1 et de collagène de type I(22, 56). La compression régule positivement les gènes de l'IL-6 chez les ostéoblastes et cette cytokine stimule la synthèse de RANKL et inhibe celle de l'ostéoprotégérine (OPG) ce qui augmente l'activité des ostéoclastes et celle-ci peut jouer un rôle en OA traumatique(22, 57). Chez les ostéocytes, on observe le même phénomène que chez les ostéoblastes en l'occurrence une augmentation du ratio RANKL/OPG(1). Ceci renchérit sur l'augmentation de la production, la différenciation et du niveau d'activité des ostéoclastes qui résulte en une augmentation du taux de remodelage osseux sous-chondral(2). Au niveau de l'os sous-chondral dans le cas d'OA, les

ostéoblastes aussi affichent une augmentation de l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) qui est un facteur de croissance des vaisseaux sanguins(58).

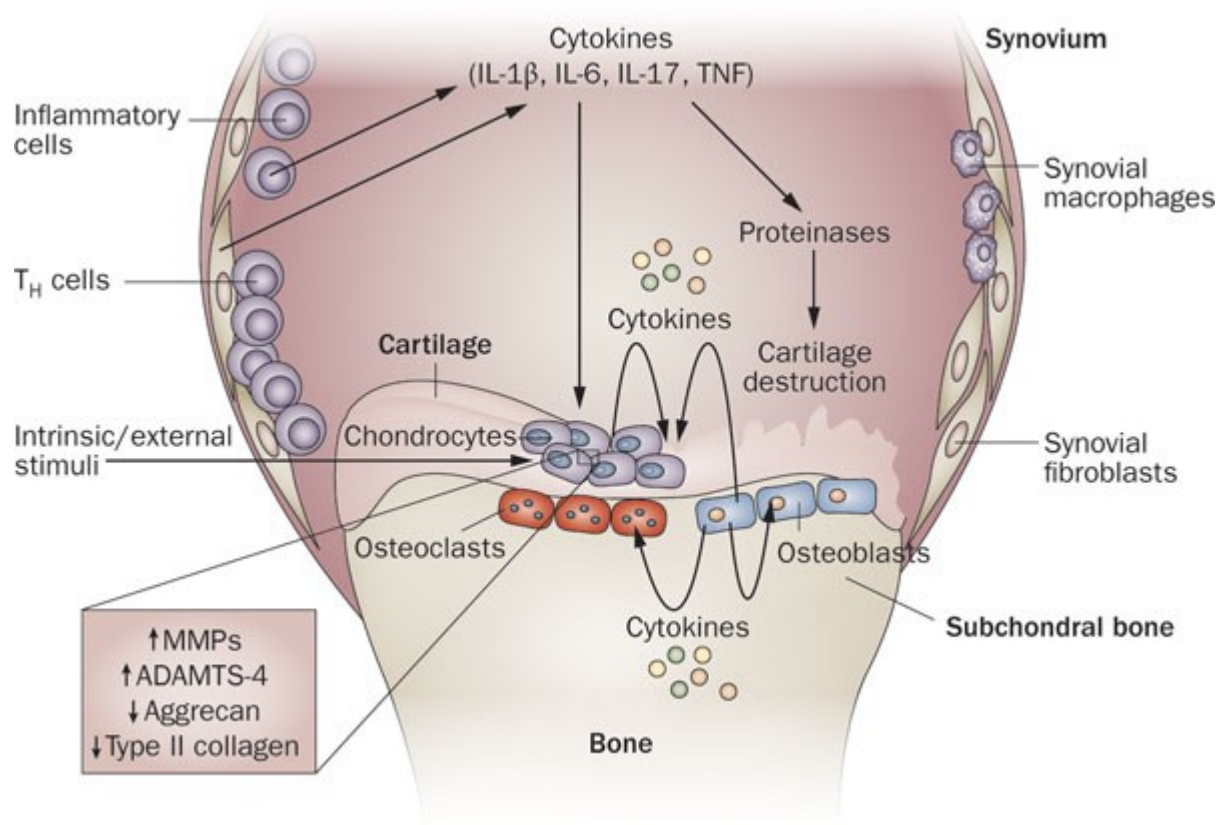


Figure 3. Pathophysiologie de l'OA(40)

### 2.2.3. Caractéristique des tissus articulaire avec arthrose

L'OA cause plusieurs lésions au niveau des différentes structures qui composent l'articulation. Si on se penche au niveau de la membrane synoviale, on observe le plus souvent une synovite qui est une inflammation de la membrane synoviale et comprend un épaissement de la membrane synoviale(59). Celle-ci paraît décolorée, congestionnée(55) et démontre une fibrose(60). Au début de l'OA, ce qui est le plus observé est une membrane synoviale enflée, avec plusieurs villosités, causée par l'œdème et l'augmentation de l'apport sanguin. Il est toutefois important de mentionner que l'inflammation présente dans la

membrane synoviale n'est que faible ou modérée contrairement à la polyarthrite rhumatoïde où l'on observe une grande inflammation de la membrane synoviale(21).

Quant au liquide synovial, sa composition change, car plusieurs molécules et débris sont relâchés par la membrane synoviale et le cartilage articulaire. Le liquide est donc moins visqueux et plus abondant qu'à la normale. On y retrouve plusieurs protéines qui n'y sont pas présentes en condition normale. On y retrouve des protéines de gros poids moléculaire comme des globulines qui sont habituellement présentes dans le sang, mais qui se retrouvent dans le liquide synovial suite à une plus grande perméabilité de la membrane synoviale. La concentration en AH et en lubrificine diminue. C'est la diminution de ces composantes qui réduit la viscosité du liquide synovial(61). On retrouve aussi des cytokines et des facteurs de croissance à des concentrations élevées. Pour les MMPs, celles-ci sont déjà présentes dans le liquide synovial, mais lorsqu'il y a de l'OA, les concentrations y sont élevées. Des fragments d'agrécan ainsi que de collagènes, surtout de type II, y sont retrouvés à des concentrations supérieures à la normale(21). Ces fragments viennent de la dégradation du cartilage par les protéases(33). L'infiltration lymphocytaire n'est pas seulement présente dans la membrane synoviale on la retrouve aussi dans le liquide synovial. On y aperçoit des lymphocytes, mais également des macrophages et des cellules de revêtement. Cependant, ces concentrations sont moins élevées que dans l'arthrite rhumatoïde.

Le cartilage articulaire est la structure où l'on observe les lésions les plus caractéristiques de l'OA. Au début de la pathologie, on observe de la fibrillation au niveau de la couche superficielle du cartilage. On voit l'érosion du cartilage, c'est-à-dire la diminution de l'épaisseur de celui-ci, au fur et à mesure que la pathologie avance(55).

Pour ce qui est de l'os sous-chondral, il y a plusieurs lésions qui sont visibles alors que la pathologie va de l'avant. Au stade précoce de l'OA, il y a un remodelage osseux accru(62) causé par l'augmentation de l'activité des ostéoclastes. Au début de l'OA, il y a donc une perte de la masse osseuse trabéculaire(1). Dans le stade avancé de la pathologie, la masse osseuse augmente, car à ce stade, les ostéoblastes entrent en jeu et augmente la synthèse de la matrice osseuse(1, 55). Dans l'os sous-chondral, il y a moins de calcium lié au collagène, car il y a une grande quantité de collagène de type I qui est produite par les ostéoblastes(63).

L'os trabéculaire devient sclérotique signifiant qu'il s'épaissit(22). Dans le stade avancé, on décèle également des lésions au niveau de la moelle osseuse. Une chose

intéressante est que l'on retrouve des lésions de la moelle osseuse là où le cartilage est très endommagé. De l'œdème, toujours dans la moelle osseuse, est observable également dans le stade avancé de l'OA et dans la plaque osseuse sous-chondrale, il y a formation de kystes(64). Un changement important observé lors de l'OA est l'augmentation du nombre de vaisseaux sanguins. Ces vaisseaux s'infiltrent par les canaux créés lors de la résorption osseuse par les ostéoclastes(1). Cette infiltration est due à la sécrétion de facteurs de croissance tel que le VEGF par les ostéoblastes(65). L'augmentation du nombre de vaisseaux s'accompagne avec l'augmentation du nombre de nerfs sympathiques et sensoriels ce qui implique une augmentation de la douleur. Ces vaisseaux et nerfs peuvent traverser la barrière os-cartilage par des microfissures(1).

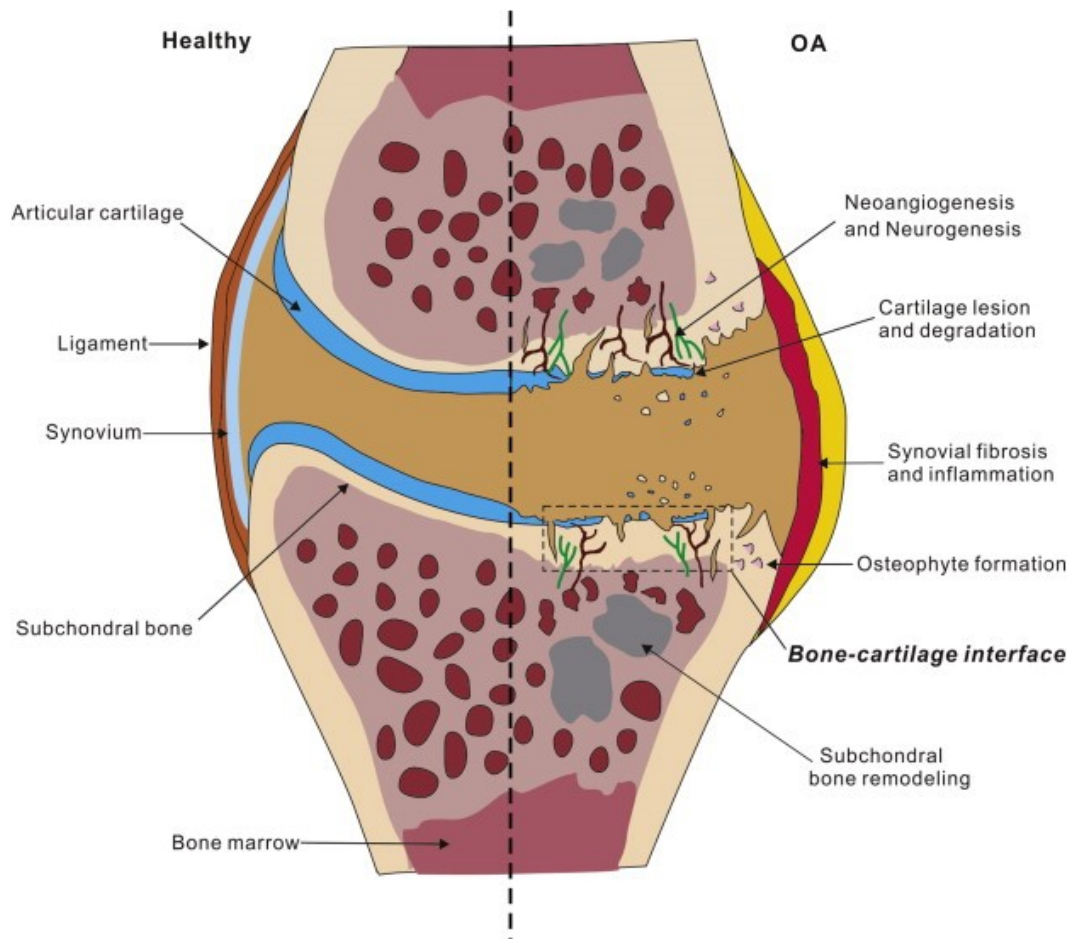


Figure 4. Cartilage normal et ayant l'arthrose(1)

#### **2.2.4. Lésions microscopiques du cartilage**

Dans la phase précoce d'OA, il y a des essais de réparation où les chondrocytes prolifèrent. Ils essaient de réparer la MEC en synthétisant certaines de ses composantes(66). Les chondrocytes s'hypertrophient et ressemblent à ceux retrouvés dans la plaque de croissance lors de la formation de l'os(59). Leur hypertrophie est qualifiée de différentielle, car elle est due à une différenciation avancée des chondrocytes. Ils calcifient la MEC et produisent du collagène de type X ainsi que de la phosphatase alcaline qui sont des marqueurs des chondrocytes hypertrophiques(63). Plus tard dans la pathologie, les chondrocytes perdent leur capacité à augmenter la biosynthèse de composantes de la MEC et ils finissent par mourir d'apoptose ou de nécrose(67). Donc il y a une diminution du nombre des chondrocytes dans le cartilage. Les chondrocytes encore vivantes développent un métabolisme catabolique et synthétisent des enzymes qui dégradent les composantes de la MEC(66). Dans le stade avancé de l'OA, il y a des microfissures qui se créent au sein du cartilage. Ces fissures vont du cartilage articulaire jusqu'à la plaque osseuse sous-chondrale. Dans certains cas, on observe aussi la duplication du « tidemark ». On assiste également à un épaissement progressif de la zone de cartilage calcifié dans le stade avancé de l'OA(1).

Pour ce qui est de la MEC du cartilage, dans la phase précoce la structure des macromolécules est perturbée causant une augmentation du niveau d'eau dans le cartilage d'où l'apparence enflée du cartilage. La diminution de l'agrégation des protéoglycanes, de la concentration de l'agrécan et de la diminution de la longueur des chaînes des glycosaminoglycanes augmentent le contenu d'eau dans le cartilage lui donnant l'air enflé(55, 68). La COMP démontre déjà une augmentation au tout début de l'OA. La fibronectine et l'asporine sont aussi augmentés(33). La perte des protéoglycanes change l'équilibre entre la pression des protéoglycanes et la tension du collagène de type II ce qui amène à une réponse altérée par rapport à la charge qui est sur l'articulation. Les chondrocytes, détectant le changement de densité dans le cartilage, augmentent l'activité anabolique et catabolique aussi bien que leur prolifération(68). La dégradation du collagène de type IX, XI et des autres macromolécules par les protéases libérées déstabilisent le réseau de collagène de type II(68). On observe une augmentation de collagènes de type II dénaturé au début de l'OA accompagné d'une perte nette de celle-ci causé par l'action des protéases(69). La conséquence de cette



séquence d'évènement est la fibrillation de la couche superficielle(66). Plus l'OA progression, plus la balance entre l'activité anabolique et catabolique fini par favoriser l'activité catabolique notamment parce que les chondrocytes meurent et il y a une diminution de la réponse aux cytokines anaboliques(68). Cela favorise la dégradation des composantes de la MEC, même le collagène de type II et l'agrecane nouvellement synthétisé(69), et amène à une dégradation du cartilage. Un tissu de granulation, fait de fibroblastes et de collagène de type I, nommé « pannus » se développe au périphérique du cartilage(66).

### 2.3. Métalloprotéases matricielles

Plusieurs protéases sont à l'origine de la dégradation pathologique du cartilage articulaire. La famille de protéases la plus connue est celle des MMPs qui constituent une très grande classe de protéases agissant sur plusieurs composantes de la matrice extracellulaire. On y retrouve les collagénases, les gélatinases ainsi que les stromelysines.

Tableau I. MMPs, leur nom alternatif et les cellules qui les produisent(70, 71)

<b>MMPs</b>	<b>Noms alternatifs</b>	<b>Cellules qui les produisent</b>
<b>MMP-1</b>	Collagénase 1, Collagénase Fibroblastique, Collagénase Interstitiel	synoviocytes
<b>MMP-2</b>	Gélatinase A, Type IV Collagénase, Gélatinase des Neutrophiles, Gelatinase de 72 kDa	chondrocytes, synoviocytes fibroblastiques
<b>MMP-3</b>	Stromelysin-1, Transin	chondrocytes
<b>MMP-8</b>	Collagénase 2, Collagénase des neutrophiles	neutrophiles, chondrocytes
<b>MMP-9</b>	Gélatinase B, Gélatinase de 92 kDa	chondrocytes
<b>MMP-10</b>	Stromélysine-2	chondrocytes
<b>MMP-11</b>	Stromélysine-3	chondrocytes
<b>MMP-13</b>	Collagénase-3	chondrocytes

### 2.3.1 Collagénases

Les collagénases (MMP1, 8 et 13) font le premier clivage sur la triple hélice du collagène de type II. Le clivage se fait proche de l'extrémité C-terminale entre le Gly775-Leu776. Il en résulte deux fragments : un mesurant  $\frac{3}{4}$  de la longueur initiale et l'autre  $\frac{1}{4}$  (Fig. 7).

La MMP1 (ou collagénase 1), est retrouvée dans les synoviocytes des patients ayant l'OA(72). La MMP1 dégrade l'agrécan, le collagène de type I, II, III, VII, IX, X et le collagène de type II dénaturé. Cependant, elle a une préférence pour le collagène de type III et possède une faible affinité pour le collagène de type II(71).

La MMP8 a une grande affinité pour le collagène de type I, mais elle clive aussi le collagène de type II, III, VII, X, l'agrécan et la protéine de liaison(7). Elle est capable de cliver l'agrécan entre Glu378-Ala379 qui est le site de prédilection des agrécánases. Par contre, son niveau d'expression est bas dans les chondrocytes du cartilage sain et arthrosique(73).

La MMP13 (ou collagénase 3) est la plus importante de sa catégorie lorsqu'il est question d'OA. Celle-ci est produite par les chondrocytes, mais son expression est également retrouvée dans l'os(71). Sa sécrétion par les chondrocytes est induite par l'action de l'IL-1 $\beta$ . Elle possède une grande affinité pour le collagène de type II et la dégrade plus vite que les deux autres collagénases(74). Elle dégrade également le collagène de type I, III, VII, X, l'agrécan et la gélatine(7). Une souris MMP13 nulle est protégée de l'OA d'où l'importance de cette enzyme dans cette pathologie(75).

### 2.3.2 Gélatinases

La prochaine classe de MMP inclus les gélatinases. Elles dégradent le collagène lorsque la triple hélice a été déjà clivée par les collagénases (voir section 2.3.1.1). La première de cette classe, la MMP2 (ou gélatinase A), dégrade des molécules comme le collagène de type IV présente dans la membrane basale, le collagène de type I dénaturé, la fibronectine et l'agrécan. Son expression est augmentée dans les chondrocytes et les synoviocytes fibroblastiques des cellules articulaires équinés *in vitro*(76) et dans les synoviocytes des chiens ayant l'OA(77). On le retrouve dans le liquide synovial des chiens ayant l'OA(71). La

deuxième gélatinase, la MMP9 (ou gélatinse B), possède la même activité que la MMP2 en plus de posséder une action élastase. Cependant, son action est moins forte que la MMP2(78). Elle est présente dans les chondrocytes des chevaux et est aussi trouvé le liquide synovial des humains et des chevaux(71).

### **2.3.3 Stromélysines**

La prochaine catégorie des MMPs comprend les stromélysines. Dans cette classe on identifie le MMP3, MMP10 et le MMP11. La MMP3, qui est aussi appelée stromlysine 1, est retrouvée dans les chondrocytes de la zone superficielle du cartilage arthrosique(79). Elle est capable de cliver l'agrécan, le collagène dénaturé et la protéine de liaison(80). La MMP3 a la capacité d'activer la préforme des collagénases(81). La MMP10 a une action semblable à la MMP3 et elle active également la préforme des collagénases. On le retrouve dans le liquide et la membrane synoviale des patients atteints d'OA(71). La MMP11 est augmentée dans le chondrocytes des cartilages arthrosiques(82).

## **2.4. Cathepsine K**

Les cathepsines font partie des protéases similaires à la papaïne, c'est-à-dire des enzymes qui ressemblent à la papaïne, une enzyme trouvée dans la papaye(83). Cathepsine, qui veut dire digérer en grec, fait référence aux protéases actives dans un milieu légèrement acide. Il existe différents types de cathepsines. On retrouve les sérines protéases, les aspartiques protéases et les cystéines protéases qui sont présentes dans les lysosomes. La cathepsine K fait partie de la famille des cystéines protéases ainsi que 9 autres protéases : la cathepsine B, C, F, H, L, O, S, V, X et W(84). Certaines de ces protéases sont exprimées dans tous les tissus et d'autres sont uniquement exprimées dans certains organes comme la cathepsine K.

### **2.4.1. Structure moléculaire**

La cathepsine K est une endopeptidase de 215 acides aminés possédant deux domaines, un domaine à droite, domaine D, et un domaine à gauche, domaine L (Fig. 5)(85). La cathepsine K possède une charge positive (+6 chez l'humain et +7 chez le lapin) car elle

possède un site, situé en bas du domaine de gauche, qui est concentré en charges positives. Le domaine de gauche possède trois hélices alpha, qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures(86), et le domaine de droite quant à lui possède un feuillet bêta très large qui se tord et s'enroule pour former un tonneau bêta. Les deux domaines sont ouverts à leur sommet et forment le site actif qui est un sillon qui s'étend sur toute la longueur du lieu créé par les domaines D et L(87). Plusieurs résidus importants sont retrouvés dans le site actif comme l'asparagine (Asp) 175 qui aide à la réaction enzymatique comme dans les autres cathepsines similaires à la papaïne. La cystéine 25 est également importante, car elle serait partiellement responsable de la constante de dissociation acide (Pka) de l'enzyme qui est d'environ 4.5(88).

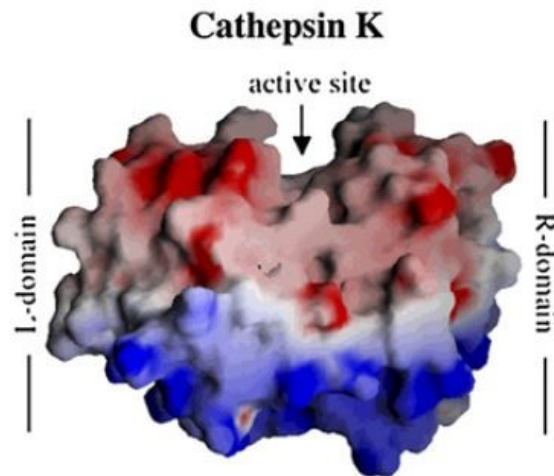


Figure 5. Structure tridimensionnelle de la cathepsine K. Le domaine L se situe à gauche et le domaine D, à droite(89)

Dans les lignes qui suivent, lorsque la position S est mentionnée, cela réfère à un site situé sur l'enzyme et lorsque la position P est mentionnée, cela réfère à un site présent sur le substrat (Fig. 6). Le site S de l'enzyme est situés vers de l'extrémité N-terminale tandis que le site S' de l'enzyme est situé vers l'extrémité C-terminale. Pour le substrat c'est le même principe, le site P est situé vers de l'extrémité N-terminale et le site P' est situé vers l'extrémité C-terminal (Fig. 6)(90). Le chiffre suivant la position P et S, par exemple P1 ou S2, indique la distance de celle-ci par rapport au site de clivage. Cela signifie que la position

P1 sur le substrat est située plus près du site où l'enzyme clive le substrat que la position P2. Dans l'enzyme, il y a une poche S1, qui est un creux dans le sillon du site actif sur la paroi du côté du domaine gauche(88), qui accueille le résidu présent au site P1 du substrat. Les acides aminés ayant une charge positive sont préférables à la position P1. Cependant, la glycine, qui est non chargée, peut être acceptée à cette position(91). La poche S2 de la cathepsine K, qui accueille le résidu présent en position P2, préfère la proline (Pro) à cette position et elle lui confère sa spécificité(91). Cependant, la cathepsine K accepte aussi les résidus suivant : leucine, isoleucine et valine(8). Elle lie difficilement d'autres substrats en P2, comme la phénylalanine, contrairement à la cathepsine B et L(92). Quant à la poche S3 présente dans la cathepsine K, elle est composée des résidus tyrosine (Tyr)67 et aspartate (Asp)61 qui permet d'immobiliser le résidu en P3, un peu comme une pince(88). Les poches S3-S1 ont plus de restriction par rapport au résidu que les poches S3'- S1'(91). La sélectivité de l'enzyme pour le substrat dépend de la spécificité de S2 et S2' ainsi que de l'état d'ionisation de l'histidine (His) en P3.

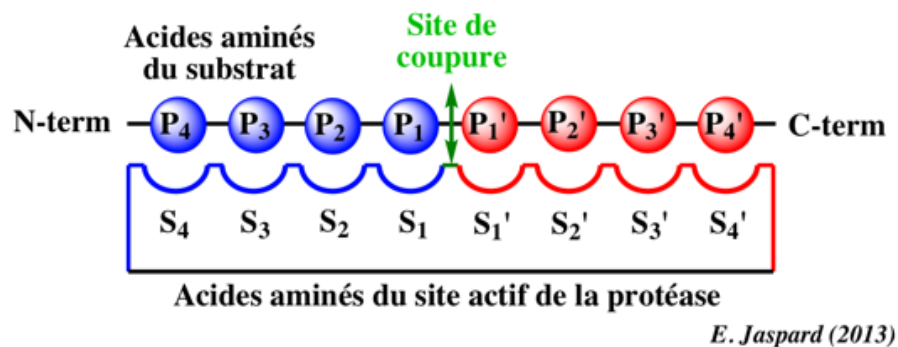


Figure 6. Exemple de poches présentes dans une protéase(93)

## 2.4.2. Régulation génique

Le gène de la cathepsine K est retrouvé dans le chromosome 1q21 et est composé de huit exons et sept introns. Il en résulte, suite aux modifications post-transcriptionnelles, en un fragment de 1.7 kb de long(94).

Il y a très peu d'information concernant la régulation de la cathepsine K dans le cartilage articulaire et plus particulièrement dans les chondrocytes. L'augmentation de l'activité de la cathepsine K est observée lors de l'OA,(5, 10) mais il y a peu d'information disponible quant aux molécules qui augmentent ou diminuent son expression et son activité. Une expérience a démontré que le N-telopeptide, produit par la dégradation du collagène de type II, induit l'ARNm et l'activité de la cathepsine K avec l'aide du calcium dans les chondrocytes du cartilage articulaire(95). Récemment, une étude a démontré une augmentation de l'ARNm de la cathepsine K lorsque le cartilage est traité avec l'IL-1 $\beta$ (96). Dû au manque d'information sur la régulation de la cathepsine K dans le cartilage, les lignes qui suivent parleront de la régulation de la cathepsine K dans l'os où elle est majoritairement retrouvée.

Le gène de la cathepsine K est exprimé en grande quantité dans les ostéoclastes, car elle est essentielle à la dégradation de la matrice osseuse. Le ligand du récepteur activateur du facteur kappa-B (RANKL) est une molécule importante, car sa liaison au RANK, récepteur présent sur les ostéoclastes, active la différenciation ou l'activation des ostéoclastes(97). En activant les ostéoclastes, RANKL stimule aussi l'ARNm de la cathepsine K et augmente l'expression de la protéine(98). L'IL-1 $\alpha$ , qui est exprimé dans les conditions pathologiques, augmente également l'expression de RANKL dans les ostéoclastes(99). Beaucoup d'autres agents régulent la production de RANKL par les cellules stromales. Parmi ceux qui le stimulent, on retrouve : la vitamine D, la parathormone, la TNF- $\alpha$ , les glucocorticoïdes, l'IL-11, l'hormone thyroïdienne, la prostaglandine-E2, le facteur de croissance des fibroblastes-2, l'histamine, «insulin-like growth factor»- 1 et lipopolysaccharides (LPS)(97). Le TNF- $\alpha$  stimule directement l'expression l'ARNm de la cathepsine K dans les ostéoclastes(100). En effet, une expérience a démontré que lorsque qu'on traite les cellules de la moelle osseuse de rat (sans les cellules stromales) avec le TNF- $\alpha$  humain, on observe une grande augmentation de l'expression de la cathepsine K(100). L'acide rétinoïque quant à lui augmente la régulation de la cathepsine K dans les ostéoclastes matures(101).

L'OPG est une molécule qui joue un rôle important dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes. L'OPG se lie au RANKL et l'empêche de se lier sur le RANK et par conséquent d'activer les ostéoclastes(102). Les autres molécules inhibant la production de RANKL sont : l'œstrogène et le facteur de croissance de transformation - $\beta$ .

Tout changement altérant le gène de la cathepsine K a des conséquences, principalement, sur l'os, car c'est dans cette structure qu'elle est majoritairement exprimée. Des mutations dans le gène de la cathepsine K amènent à une pathologie appelée pycnodysostose. C'est une pathologie rare autosomale récessive où l'on observe la mutation de l'Arg24 sur l'exon 6 et de l'Alanine277 sur l'exon 7(103). Les patients ayant cette maladie ont les caractéristiques suivantes : une ostéosclérose, une petite taille, une acroostéolyse (résorption des phalanges distales, une déformation progressive des doigts et orteils, les extrémités deviennent raccourcies et enflées), une fragilité osseuse, une dysplasie de la clavicule et une déformation de l'ossature. Dans cette pathologie, les ostéoclastes sont incapables de dégrader le collagène de type I présent dans la matrice osseuse(104). Une mutation dans le gène de la cathepsine K peut également amener à l'ostéopétrose qui est une pathologie où la masse de l'os augmente. Elle existe en forme autosomale dominante et récessive(105). Les souris complètement déficientes de la cathepsine K développent cette pathologie osseuse(97).

### **2.4.3. Sites de clivage de la cathepsine K sur le collagène et l'agrécan**

La cathepsine K est une endopeptidase, c'est-à-dire qu'elle hydrolyse les liaisons peptidiques internes(106). Elle est connue pour son rôle dans l'os (voir section 2.5.2.) et dégrade donc des composantes de la matrice osseuse.

#### **2.4.3.1. Clivage du collagène de type I**

Le collagène de type I est une triple hélice faite de deux chaînes alpha 1 et une chaîne alpha 2(107). La cathepsine K coupe le collagène de type I à plusieurs sites et la plupart des sites de clivage sont près de l'extrémité N-terminale et de l'extrémité C-terminale(108). On retrouve un clivage au résidu 811 sur la chaîne  $\alpha 1$  et un autre sur le résidu 815 sur la chaîne alpha 2 à partir de l'extrémité N-terminale. Il y a également un clivage au 97<sup>e</sup> résidu sur la chaîne alpha 1 et au 100<sup>e</sup> résidu sur la chaîne alpha 2 à partir de l'extrémité N-terminale. La cathepsine K clive également le 22<sup>e</sup> résidu dans les deux chaînes(108). Atley et al(109) ont démontré que la cathepsine K libère le N-télopeptide du collagène de type I.

#### 2.4.3.2. Clivage du collagène type II

Il y a quelques années Kafienah et al(8), ont démontré que la cathepsine K dégrade également le collagène de type II bovin et humain. Leur expérience a permis de démontrer que la cathepsine K clive la triple hélice du collagène de type II près de l'extrémité N-terminale et qu'elle fait son clivage à l'intérieur de la molécule (Fig. 7)(8). Récemment, Mort et al(11) ont trouvé six sites de clivage de la cathepsine K sur le collagène de type II équin dont le premier site de clivage se trouve trois résidus (d'acides aminés) avant le site de clivage identifié par Kafienah et al(8). Mort et al ont également proposé que la cathepsine K dégrade progressivement la molécule de collagène de type II à partir de l'extrémité N-terminale en enlevant premièrement 60 résidus d'acides aminés(11). L'activité de la cathepsine K est optimale à des pH plus acides (4 à 6.5) et elle est diminuée à un pH neutre(8). Il est important de mentionner que l'activité collagénique de la cathepsine K exige la présence de chondroïtine sulfate ou de kératane sulfate(110). Comme le collagène de type II est principalement trouvé dans le cartilage, la cathepsine K doit trouver une source de chondroïtine sulfate à même le cartilage (voir la section sur l'agrécan plus loin).

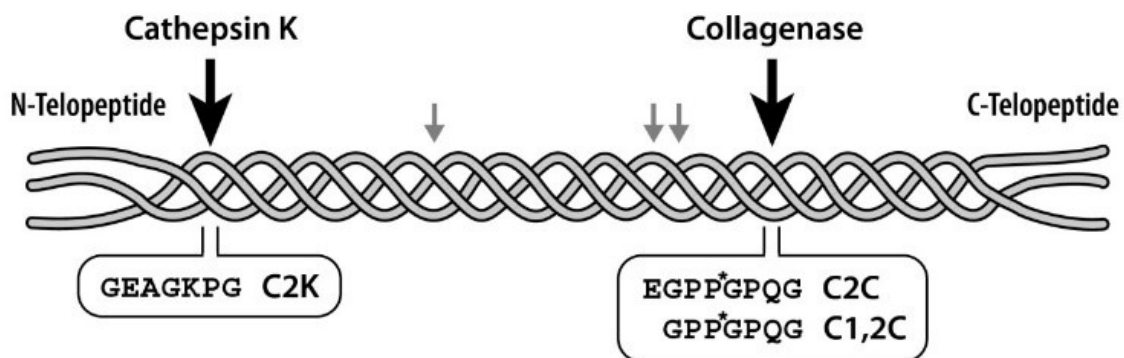


Figure 7. Clivage du collagène de type II par la cathepsine K et les collagénases(111)

#### 2.4.3.3. Clivage de l'agrécan



La cathepsine K dégrade l'agrécane, protéoglycane retrouvée dans la matrice du cartilage, afin de s'approvisionner en chondroïtine sulfate nécessaire à son activité collagénique(110, 112). Une expérience faite chez les bovins a montré que la cathepsine K clive l'agrécane entre Arg24-Leu25 et Gly56-Ser57 à partir de l'extrémité N-terminal(113). La cathepsine K est également capable de cliver d'autres composantes de l'agrécane comme son domaine globulaire entre serine19 et valine20. Au total, il y a cinq sites de clivage sur l'agrécane, quatre sur le domaine G1 et un dans le domaine E1 (Fig. 8)(113).

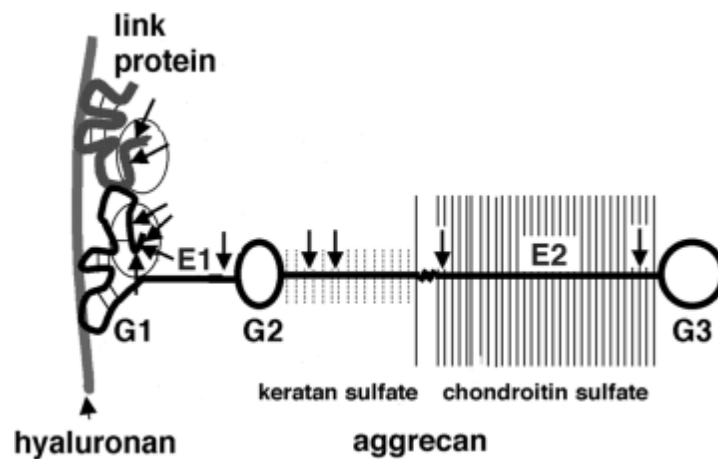


Figure 8. Site de clivage de la cathepsine K sur l'agrécane(113)

## 2.4.4. Emplacement

### 2.4.4.1. Physiologique

La cathepsine K a été trouvée dans certaines parties de l'embryon en développement notamment dans le tissu épithélial, le système gastro-intestinal, le système respiratoire et dans le système urinaire. L'expression est plus élevée dans l'os(114).

La cathepsine K est majoritairement trouvée dans les ostéoclastes(115). Son rôle important dans la résorption osseuse est démontré par le fait que 60 % de l'activité hydrolytique, dans les cellules semblables aux ostéoclastes dans la souris, a été inhibée par un anticorps anti cathepsine K(9).

Dans le cerveau de souris où le gène de la cathepsine K a été retiré (CTSK<sup>-/-</sup>), on voit une diminution du nombre d'astrocytes qui est plus marquée dans le cortex et a un impact sur l'apprentissage et sur la mémoire spatiale et non spatiale(116). Un changement dans le système dopaminergique a aussi été observé dans la souris CTSK<sup>-/-</sup>. Une étude sur la schizophrénie a démontré que la cathepsine K est régulée positivement dans le cerveau schizophrène, et ce pour l'humain et le rat(117). L'expression de la cathepsine K a été observée dans plusieurs neurones de la matière blanche, dans les cellules du plexus choroïde et dans les oligodendrocyte(117). Tous ces résultats montrent le rôle important de la cathepsine K dans certaines fonctions du cerveau.

Une étude ayant été faite chez le porc a montré la présence de la cathepsine K dans sa glande thyroïde. La présence de la cathepsine K a été constatée dans les lysosomes de cellules thyroïdiennes(118). Il est possible que la cathepsine K aide à la libération de l'hormone T4 en clivant la prohormone afin que celle-ci acquière sa forme mature(118).

#### 2.4.4.2. Pathologique

Certaines conditions pathologiques stimulent l'expression de la cathepsine K. On observe l'expression de la cathepsine K dans plusieurs cancers comme le cancer du sein où son expression est élevée dans les cellules tumorales et dans les métastases de ces tumeurs. La cathepsine K est nouvellement produite dans le stroma des cellules tumorales et peut favoriser ou moduler la croissance invasive des cellules tumorales(119). Il est possible que la cathepsine K permette aux cellules tumorales de se métastaser(120). Herroon et al(121) ont remarqué une augmentation de cathepsine K dans le cancer de la prostate qui se métastase dans l'os. Cela aurait une corrélation avec la progression accélérée de la tumeur et la dégradation de l'os(121). Dans le stroma de l'adénocarcinome pulmonaire, la cathepsine K a été trouvée dans les tissus desmoplastiques (terme qui réfère à la croissance de tissu fibreux ou de tissus conjonctifs) du tissu fibreux des composantes invasives de la tumeur. La cathepsine K serait aussi exprimée dans les mélanomes(122).

Une augmentation de l'expression de la cathepsine K dans les macrophages présents dans les athéromes a été observée(123). Une étude menée par Helske et al(124) a montré que le niveau de cathepsine K est élevé dans les valves aortiques ayant de la sténose suggérant qu'elle dégrade les composantes de la MEC. Une augmentation de l'ARNm et de la cathepsine K a également été observée dans les macrophages présents lors de l'athérosclérose(125).

Pour ce qui est de l'obésité, Chiellini et al(126) ont montré que chez la souris résistante à la leptine, il y a une régulation positive de la cathepsine K. Chez les jeunes souris déficientes en cathepsine K, il y a une diminution de la masse graisseuse présente alors que chez les souris adultes, il n'y a pas de prise de poids(127). Yang et al(128) ont également démontrés que la cathepsine K est impliquée dans l'obésité. La cathepsine K est également présente dans les chondrocytes. Lors de l'OA, il a été démontré que la cathepsine K est induite par les chondrocytes altérés humains (129) et son produit de dégradation est plus présent dans le cartilage des adultes ayant l'OA que dans le cartilage des adultes sains(5). L'expression de la cathepsine K est aussi augmentée dans la membrane synoviale de lapin ayant l'OA, dans le stage précoce de la pathologie(130), et est retrouvé dans les synoviocytes fibroblastiques ayant la PR(131).

#### **2.4.5. Inhibiteurs**

Étant donné que la cathepsine K est impliquée dans plusieurs pathologies (voir section 2.4.4) la recherche d'inhibiteurs de celle-ci est vivement recherchée. Il existe plusieurs inhibiteurs de la cathepsine K. On retrouve des inhibiteurs naturels, c'est-à-dire qu'ils sont synthétisés par l'organisme. Parmi eux on retrouve les inhibiteurs de la superfamille des cystatines dans lesquels il y a les stefins, les cystatines, les kininogènes et les inhibiteurs dérivés de la cystatine(89).

Il y a aussi des inhibiteurs synthétiques disponibles. Plusieurs inhibiteurs de la cathepsine K ont été développés particulièrement pour l'ostéoporose où son rôle dans cette pathologie est très bien connu(132). L'Odanacatib est probablement l'inhibiteur le plus connu et était très prometteur(133). L'Odanacatib est un inhibiteur réversible de la cathepsine K, qui est très sélectif pour l'enzyme et lorsqu'administré, il diminue les marqueurs de la résorption osseuse tels que NTX-I et CTX-I chez l'humain(134). Par contre il a été retiré du

développement dernièrement parce qu'il y avait des effets secondaires sériques reliés à son utilisation. Il y a également la Balicatib qui a atteint la phase II(135). Cet inhibiteur augmente la densité minérale osseuse dans la colonne vertébrale et le fémur lorsqu'administré à des singes femelles(136). Le ONO-5334, qui également atteint la phase II, restaure la densité minérale osseuse et supprime le CTX-I dans le plasma des rats femelles(137). Le Relacatib, qui a complété la phase I, supprime le marqueur de dégradation osseuse lorsqu'administré à des singes femelles(138).

Un inhibiteur synthétique pour l'OA, le SB-553484, a été testé chez les chiennes Beagle afin de voir son potentiel sur l'inhibition de la cathepsine K dans l'OA. Une ménisectomie a été effectuée sur les chiennes afin de produire l'OA. L'inhibition de la cathepsine K par le SB-553484 a démontré une diminution du biomarqueur de la dégradation de l'os, le télopeptide C-terminal du collagène de type I (CTX-I), et du cartilage, le télopeptide C-terminal du collagène de type II (CTX-II), dans l'urine. Une diminution de CTX-I a été observée avec diminution significativement de l'inhibiteur, démontrant une réduction du renouvellement osseux et suggérant une inhibition fonctionnelle de la cathepsine K *in vivo* (139). Le niveau de CTX-II a également été significativement diminué par le SB-553484. (139). Dossetter et al (140) ont montré que la AZD4996 pourrait être un potentiel inhibiteur synthétique de la cathepsine K dans l'OA. L'AZD4996 a été testé *in vivo* chez le chien et une inhibition maximale était observable à 0.1mg/kg. Cela fait de cette molécule un bon candidat pour les essais cliniques (140).

La cordycépine, un nucléoside isolé de la *Cordyceps militaris*, a montré des propriétés régulatrices pour cathepsine K. Une étude récente, faite par Hu et al (141), a démontré qu'elle régule l'expression de la cathepsine K et S en diminuant l'expression de leurs gènes dans des chondrocytes humains stimulés à l'aide de l'IL-1 $\beta$ . Cette molécule pourrait être plus étudiée afin de voir son utilité dans plusieurs pathologies impliquant la cathepsine K (141).

Quant à l'inhibition de la cathepsine K chez les équins, le VEL-0230 a été reporté comme étant un bon candidat(142). Le VEL-0230 a démontré qu'il inhibe rapidement le CTX-I dans le plasma lorsqu'administré au 3.25 jours et au 7 jours(142).

## 2.5. Biomarqueurs

Étant donné que l'OA est une maladie dégénérative progressive caractérisée par une destruction du cartilage articulaire, il est primordial de pouvoir diagnostiquer la maladie dans son stade précoce afin de ralentir sa progression et ainsi préserver le tissu. Présentement, il a diverses façons de diagnostiquer l'OA. La radiographie est l'approche classique et économique, mais permet de diagnostiquer la maladie seulement lorsqu'il y a des changements structurels avancés tels que des ostéophytes périarticulaires, de la sclérose ou des kystes de l'os sous-chondral et une diminution de l'espace intraarticulaire. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de diagnostiquer l'OA plus tôt, mais son coût élevé limite parfois son utilisation (143, 144). Une avenue qui est de plus en plus étudiée pour le diagnostic plus précoce de l'OA est l'utilisation de biomarqueurs (marqueurs biologiques)(145). D'après l'Organisation mondiale de la santé, un biomarqueur est une substance, structure ou un processus qui peut être mesuré dans le corps ou ses produits et influencer ou prédire l'incidence de l'issue ou d'une maladie(146). L'utilisation d'un biomarqueur permettrait non seulement de diagnostiquer la maladie dans son stade précoce, mais aussi de quantifier la progression de la maladie et le changement présent dans le cartilage.

Le terme «biomarqueur » inclus non seulement des analytes solubles qu'on peut retrouver dans des fluides biologiques (ex : urine ou sang), mais également des marqueurs anatomiques qu'on peut détecter par radiographie ou l'IRM, des marqueurs physiologiques mesurer par l'analyse de démarche et même des mesures histologiques par biopsie(147).

Pour ce qui est de l'OA, si on se concentre sur les biomarqueurs solubles, il a plusieurs catégories de biomarqueurs. Un de ces catégories est les biomarqueurs de l'inflammation dans l'OA, mais ils ne sont pas spécifiques à l'articulation. On y retrouve comme biomarqueurs les cytokines, adipokines, les macrophages activés, le système du complément per exemple(148). On y retrouve aussi les biomarqueurs reliés au métabolisme (synthèse et dégradation) du collagène, au métabolisme de l'agrécan, aux autres protéines non collagéniques et à d'autres processus tel que l'interaction cellulaire dans l'os(145).

### **2.5.1. Activité des MMPs sur collagène II: biomarqueur spécifique de dégradation cartilagineuse**

Il sera question ici des biomarqueurs qui sont reliés à la dégradation du collagène de type II qui est spécifique au cartilage. Parmi les plus connus qui résultent de l'action des enzymes MMPs : le CTX-II, le C2C et le PIINAN(145). Le CTX-II est généré par le clivage de l'extrémité C-terminale du collagène de type II par les collagénases(149). Le C2C est généré par l'action des collagénases au site de clivage situé  $\frac{3}{4}$  de la longueur du fragment du collagène de type II à partir de l'extrémité N-terminale(14, 150). Le PIINANP résulte du clivage du propeptide du collagène de type II par les MMPs(151).

Il existe quelques tests ELISA sur le marché qui permet de mesurer des biomarqueurs de la dégradation du collagène de type II par les collagénases. L'ELISA mesurant le CTX-II est celle qui est le plus connue. Il a développé originellement avec un anticorps monoclonal contre une séquence située au télopeptide (EKGPDP). Il a été testé dans l'urine des patients ayant l'OA et le PR où une augmentation significative de CTX-II a été observée chez les patients ayant le PR et l'OA comparés aux patients sains(149).

L'ELISA C2C, quant à elle, a été produite avec un anticorps monoclonal reconnaissant cette séquence : CGGEGPPGPQG(150). Le kit pour l'ELISA C2C est disponible auprès de la compagnie IBEX Pharmaceutical. Le C2C, mesuré dans le sérum, a démontré une corrélation positive avec la technique quantitative d'IRM T2 fait sur le cartilage de patients male ayant l'OA du genou(152).

Comme il est maintenant connu que la cathepsine K est en mesure de dégrader le collagène de type II(8) et qu' elle pourrait également avoir une action aussi importante dans la dégradation du collagène de type II que le MMPs lors de l'OA(10). Son activité de dégradation du collagène de type II a le potentiel pour le développement d'un biomarqueur spécifique à son activité.

### **2.5.2. Activité de la cathepsine K sur collagène I: biomarqueur spécifique de dégradation osseuse**

Des études *in vitro* ont montré que la cathepsine K libère un épitope situé au N-télopeptide du collagène type I lorsqu'elle le dégrade. Cet épitope est retrouvé dans l'urine et pourrait être utilisé comme biomarqueur pour la résorption osseuse par les ostéoclastes(109). La cathepsine K génère aussi un C-télopeptide (CTX) lorsqu'elle clive le collagène de type I. Garnero et al(153) ont suggéré que l'épitope généré pourrait être un biomarqueur pour l'ostéoporose, la maladie de Paget et les métastases osseuses ostéolytiques. Cet épitope est retrouvé dans le plasma et dans l'urine et pourra permettre d'évaluer s'il y a un renouvellement osseux(153).

### **2.5.3. Activité de la Cathepsine K sur collagène II: biomarqueur spécifique de dégradation cartilagineuse**

Pour ce qui est des ELISAs mesurant la dégradation du collagène de type II par la cathepsine K, il n'y a aucun test qui ait été commercialisé. Cependant, Dejica et al(5) ont développé, pour les besoins d'une étude, un ELISA d'inhibition compétitive (C2K) contre un site de clivage de la cathepsine K situé près de l'extrémité C-terminale du collagène de type II humain. Il a été développé avec un anticorps polyclonal reconnaissant la séquence suivant EAGKPG(5). L'étude a démontré que les patients atteints d'OA affichaient une quantité plus élevée de C2K que les patients sains(5).

Le C2K a été testé sur le cartilage équin ayant l'OA et a démontré des résultats positifs(10). Nous avons tenté de développer une ELISA pour les équins avec le C2K, mais cela n'a pas fonctionné.

Récemment, des sites de clivages, de la cathepsine K sur le collagène de type II équin, ont été identifiés par Mort et al(11) et un anticorps (C2K77) a été produit contre le premier site de clivage situé près de l'extrémité N-terminale Ce nouvel anticorps a démontré sa capacité à détecter le premier site de clivage dans cartilage équin ayant l'OA lors d'analyses d'immunohistochimie. Ce résultat encourageant a ouvert une porte afin de développer une ELISA spécifique pour les équins qui pourrait nous donner plus d'informations sur le rôle de

la cathepsine K dans l'OA. D'autant plus que la cathepsine K est présente dans la zone superficielle lors de l'OA(10). Elle pourrait être responsable de la fibrillation observée au début de l'OA(55) et pourrait être un marqueur de dégradation précoce du cartilage dans l'OA.

L'ELISA développée sera adaptée du protocole de Dejica et al(5). Étant donné que le peptide utilisé pour le développement est petit, une ELISA compétitive est mieux adaptée(154). Ce type d'ELISA permet de voir la sensibilité de l'anticorps pour le peptide et permet l'analyse d'échantillons plus complexes, c'est-à-dire qui n'ont pas été purifiés(155).

## **2.6. ELISA**

La méthode immuno-enzymatique (enzyme linked immunosorbent assay en anglais), ELISA comme abréviation, permet de détecter de façon qualitative ou de mesurer de façon quantitative un antigène ou un anticorps.

### **2.6.1. Les différentes méthodes d'ELISA**

Il a principalement trois variantes d'ELISA qui peuvent servir pour la détection : la directe, l'indirecte et le sandwich.

Dans la première variante de l'ELISA, un antigène, lié sur une plaque, interagit avec un anticorps primaire spécifique couplé à une enzyme. Cette enzyme interagit avec un substrat chromogène afin de libérer une composante de couleur qui permettra de quantifier l'antigène(156).

L'ELISA indirecte a le même principe que le direct. La seule différence c'est qu'un anticorps secondaire, couplé à une enzyme, reconnaît l'anticorps primaire(158).

L'ELISA sandwich, deux anticorps reconnaissent l'antigène dans des sites différents. Un des anticorps est lié à la plaque et l'autre est lié soit à une enzyme ou à un anticorps secondaire qui lui est couplé à une enzyme.

Les trois types d'ELISA peuvent être utilisés comme la base d'un groupe de test immunologique appelé ELISA d'inhibition ou de compétition. Comme The ELISA Guidebook le dit, le terme compétition décrit un test dans lequel la mesure implique la quantification d'une substance par son habilité à interférer avec un système préitéré établi(156).



Tout dépendamment de quel type d'ELISA (direct, indirect ou sandwich) est utilisé pour quantifier une substance, il y a certaines étapes de l'ELISA compétitive qui sont commune pour les trois types d'ELISA. Dans l'ELISA compétitive, plus il y a d'antigène dans l'échantillon, plus le signal sera faible, car il y aura moins d'anticorps libres pour lier l'antigène présent dans le puits d'où l'aspect compétitif(Fig. 9)(155) .

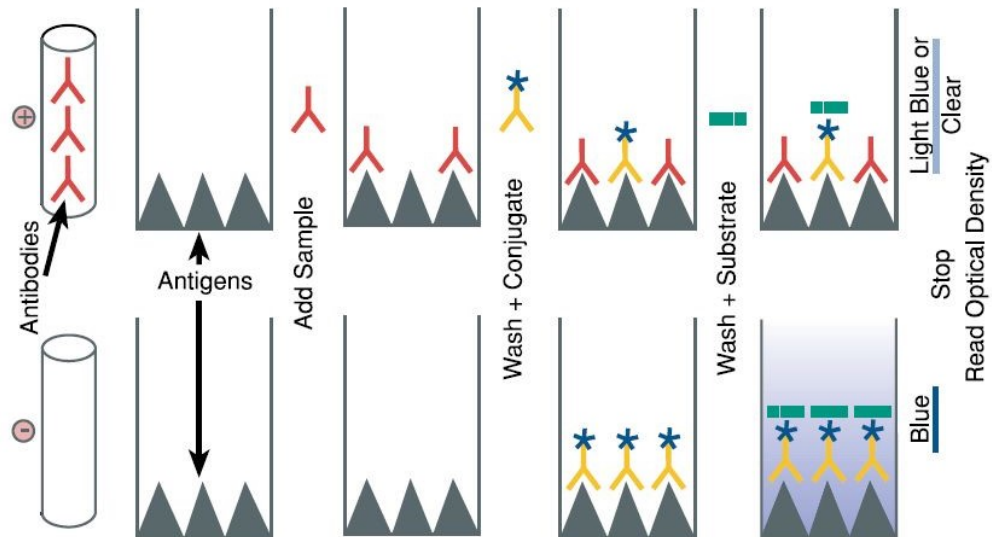


Figure 9. ELISA d'inhibition compétitive(155)

## 2.6.2. L'utilité de L'ELISA

Les tests immunologiques, tels que l'ELISA, sont très utilisés dans le milieu pharmaceutique et médical. L'ELISA peut servir à diagnostiquer des maladies, à surveiller l'effet thérapeutique d'un médicament, à observer la pharmacocinétique clinique et les études de bioéquivalence dans la découverte de médicament(159).

L'ELISA est un test de choix, car elle procure plusieurs avantages. C'est un test qui est spécifique à cause de la sélectivité de l'anticorps pour son antigène(159), qui est aussi simple à utiliser et qui est rapide, car il peut être effectué en quelques heures. C'est également un test diagnostique qui est peu dispendieux comparer à plusieurs tests comme l'imagerie en résonance magnétique (IRM) et qui peut être fait presque à n'importe quel lieu. Il y a encore plusieurs avantages à utiliser une ELISA, mais ceux-là sont les plus cités(156).

### 3. Hypothèse et objectifs

#### Hypothèse

L'activité de la cathepsine K dans le cartilage est mesurable par une ELISA, spécifique au site de clivage de la cathepsine K, similaire à ceux développés pour les collagénases de la famille des MMPs.

#### Objectifs

1. Développer un nouveau test ELISA d'inhibition compétitive spécifique contre un néo-épitope généré par le clivage du collagène de type II équin par la cathepsine K.
2. Mesurer la dégradation du collagène de type II *in vitro* dans le cartilage normal, stimulé et ayant l'OA et déterminer quelles cytokines régulent l'activité de la cathepsine K.
3. Comparer l'activité de la cathepsine K et des MMPs collagénases dans les explants de cartilage stimulé et dans le cartilage normal et OA fraîchement isolé.

## 4. Article

### **C2K77 ELISA for detection of degradation of articular cartilage by cathepsin K**

Beatriz Noé, Robin A. Poole, John S. Mort, Helene Richard, Guy Beauchamp, Sheila Laverty

(soumission à Osteoarthritis and Cartilage)

#### **Introduction**

Osteoarthritis (OA) is progressive degenerative joint disease characterized by articular cartilage degeneration, subchondral bone remodelling, synovial inflammation and pain(1). Many factors can trigger OA including trauma, overuse, aging, obesity(2) and genetic predisposition(3).

Type II collagen is the most abundant collagen in the extracellular matrix of articular cartilage and estimated to be 95% of the total collagen content(4). The type II collagen molecule is mainly composed of a triple helix of three identical  $\alpha$ -chains (homotrimers). The three-dimensional network of fibrillar type II collagen imparts tensile strength and is essential for maintaining the shape and volume of cartilage(4). In OA, the triple helical type II collagen network is progressively degraded by enzymatic digestion and its destruction is a key irreversible event in cartilage matrix degeneration in OA(5).

The type II collagen helix is a highly resistant structure and few vertebrate proteases are able to perform its initial cleavage while it is intact. Following this primary cleavage, the molecule is believed to unwind and becomes susceptible to additional cleavage by a greater number of enzymes in the extracellular matrix. This primary cleavage is an initial key step on the path to cartilage matrix degradation and loss in OA(6). The matrix metalloproteinase collagenases (MMPs) are believed to be important enzymes involved in this primary cleavage of type II collagen in OA(6). MMPs 1, 8 and 13 cleave type II collagen near the C-terminal end then allowing other proteases to further degrade the collagen. The major culprit for type II

collagen degradation in OA is thought to be MMP 13(7). However, another protease, cathepsin K, could play an important role in cartilage degradation that occurs in OA.

Cathepsin K has the capacity to cleave type II collagen and, can cleave it at multiple sites (8, 11). Cathepsin K, is a cysteine protease that degrades many cartilage matrix molecules including proteoglycans and type I and II collagens<sup>0</sup>. This endopeptidase was originally found in osteoclasts with an important role in bone resorption(160). Now we know it is also present in chondrocytes(10). In contrast to the MMPs, cathepsin K cleaves type II collagen by trimming from close to the N-terminus at a variety of sites in the triple helix(11). Immunohistochemical studies have revealed an increased abundance of cathepsin K and its degradation products, of cleaved type II collagen, adjacent to chondrocytes in OA cartilage suggesting it plays a role in matrix degradation in equine(10) and human(5, 111) joint disease.

The stimulation of collagenase activity involved in type II collagen degradation in OA has been well studied(12-14) but little is known about the regulation of cathepsin K. Such knowledge of cathepsin K activity would help understand its role in disease, including OA, and could potentially lead to the development of a biomarker of OA.

Cathepsin K cleavage sites, specific for equine type II collagen, have been recently identified and an antibody against one such cleavage site (C2K77) has been raised in rabbits(11). Immunostaining of OA cartilage sections revealed the antibody's capacity to detect the cathepsin K cleavage in OA cartilage(11) suggesting the antibody may be a suitable candidate for an ELISA immunoassay.

We hypothesized that cathepsin K activity in cartilage is measurable by a cathepsin K specific cleavage site ELISA, similar to those developed for MMP collagenases(14, 150). Our first objective was to develop a novel, species-specific, competitive ELISA inhibition-assay directed against a neo-epitope generated by the cathepsin K cleavage of equine type II collagen. Our second objective was to measure type II collagen degradation by cathepsin K *in vitro* in normal, stimulated and OA cartilage and determine which cytokines regulate cathepsin K activity. Because cathepsin K activity may be comparable to that of MMP collagenases, our third objective was to compare cathepsin K and collagenase activity in stimulated cartilage explants and also in freshly isolated control and OA cartilage.

## **Methods**

### **Development of competitive C2K77 ELISA**

#### *C2K77 ELISA:*

The anti-neoepitope (C2K77) antibody was produced by immunizing rabbits with a synthetic peptide, KPGKSGGC, that includes the equine type II collagen cleavage (the most *N*-terminal cleavage) neoepitope generated by cathepsin K(11). The C2K77 immunizing peptide and the purified antibody were titrated to attain the optimal operational concentrations for establishment of the competitive C2K77 ELISA and The ELISA was also validated (supplementary information online). The C2K77 ELISA was then employed to detect the specific cathepsin K generated neoepitopes contained in type II collagen cleavage fragments, and released from cartilage or present in the cartilage matrix, under a variety of experimental conditions, to better understand the involvement of cathepsin K activity in health and pathology.

### **Equine articular cartilage**

The articular cartilage was harvested from healthy and osteoarthritic equine metacarpophalangeal (MCP) joints obtained from a local abattoir or from horses donated to the veterinary teaching hospital at the Université de Montréal (CHUV-St-Hyacinthe, QC, Canada). Specific details of all specimens employed in the subsequent experiments are provided in Table II. The joints were opened (aseptically for culture experiments) and the articular cartilage was inspected macroscopically. Healthy cartilage was articular cartilage with no visible macroscopic lesions. OA cartilage was cartilage with fibrillation, or immediately adjacent to complete erosion sites (supplementary information online).

### **Assessment of C2K77 ELISA by digestion of healthy cartilage with cathepsin K to generate collagen cleavage fragment release over time**

Healthy equine cartilage (specimen nos. 1-3; Table II) was chopped into small pieces and placed in Eppendorf tubes containing PBS. The cartilage pieces were then incubated in 2 ml of digestion buffer at 32°C and agitated for 24 hrs with 250 nM recombinant human cathepsin K (personal communication Alex Emmott). Aliquots of the digestion buffer were

harvested at t0, t8 and t24 h. Trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) was immediately added to each aliquot to inhibit cathepsin K activity. Control cartilage was subjected to the same treatment but without the addition of cathepsin K. The supernatants were placed in Eppendorf tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until immunoassay with the C2K77 ELISA. On termination of the cathepsin K and control digestions, the cartilage was collected, blotted dry, weighed and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . In order to solubilize the C2K77 neoepitopes in the cartilage matrix, similar to previous studies(5), a part of the remaining cartilage was digested with  $\alpha$ -chymotrypsin. The  $\alpha$ -chymotrypsin activity was then inhibited by the addition of N-tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl ketone (TPCK). The digestion buffer was then analyzed in duplicate with the C2K77 ELISA (supplementary information online). A repeated-measures linear model was used with the group (control or cathepsin K digested) as a between-subject factor and time points as within-subject factors. *A priori* contrasts were used to compare the pairs of means, and the alpha level for each contrast was adjusted downward using the sequential Benjamini-Hochberg procedure.

### **Histology and C2K77 immunohistochemistry of healthy equine cartilage digested with cathepsin K**

Histology was performed to detect cathepsin K degradation of proteoglycan (Safranin fast O fast green staining) and immunohistochemistry was performed to detect cathepsin K degradation of type II collagen (supplementary information online).

### **Ability of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ +OSM, TNF- $\alpha$ +OSM) or LPS to stimulate cleavage by cathepsin K in cultured healthy equine cartilage explants and comparison to endogenous non-stimulated cathepsin K mediated type II collagen cleavage in OA explants**

Full depth articular cartilage was harvested under aseptic conditions from healthy equine MCP joints (n = 3) (specimens 4-6, Table II) and from joints with OA (n=3) (specimens 7-9, Table II). The cartilage was placed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen Canada Inc.) containing antibiotics/anti-mycotic agents (supplementary information online).

To simulate inflammatory stimuli encountered in joint disease, culture wells contained IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) (Kingfisher Biothech USA); IL-1 $\beta$  and OSM (1 ng/ml and 10 ng/ml,

respectively) (OSM: Preprotech, USA); TNF- $\alpha$  and OSM (10 ng/ml and 10 ng/ml, respectively) (TNF: Preprotech, USA) and LPS (10 ug/ml) (Sigma-Aldrich, USA). Wells without these additives served as controls. The culture media was harvested and replaced every 7 days, up to day 21 and stored in Eppendorf tubes and frozen at -20°C.

The supernatant at each time point and for each condition were immunoassayed employing the C2K77 ELISA and C1,2C ELISA (IBEX Technologies Inc., Montreal, Quebec, Canada), the latter assay a specific biomarker of type II collagen cleavage by MMP collagenases.

A comparison was made between stimulated explant groups (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ +OSM, TNF- $\alpha$ +OSM, LPS) and their control unstimulated samples at t0. Data were transformed with the logarithm base 10 to normalize the distributions. A repeated-measures linear model was used with the condition (control, cytokine stimulation groups or OA) as a between-subject factor and time points as within-subject factors. *A priori* contrasts were used to compare pairs of means, and the alpha level for each contrast was adjusted downward using the sequential Benjamini-Hochberg procedure.

### **Concentration of C2K77 and C1,2C neoepitopes in fresh normal and OA cartilage**

Cartilage was harvested from healthy equine joints (n=8) (specimens 10-17, table II) and joints with macroscopic evidence of OA (mild n=8, moderate n=4, severe n=1) (specimens 18-30, table II) and sliced in small pieces. The cartilage was immediately treated with  $\alpha$ -chymotrypsin, overnight as described above and the digested samples were stored in Eppendorf tubes and frozen at -20°C until immunoassay in duplicate. A linear model (ANOVA) with the class as a factor was used to detect differences between groups.

All Statistical analyses were conducted with SAS v.9.4 (Cary, N.C.). The level of statistical significance was set at 5% throughout (supplementary information online)

Tableau II. Details of specimens employed in cathepsin K digestion, in cartilage explant and in  $\alpha$ -chymotrypsin digestion of fresh and OA cartilage study.

Specimens	Ages(years)	Macroscopic appearance	Experiment
1	N/A	Healthy	Cathepsin K Digestion
2	N/A	Healthy	
3	10	Healthy	
4	2	Healthy	Cartilage Explant
5	4	Healthy	
6	7	Healthy	
7	5	OA Moderate	
8	21	OA Moderate	
9	30	OA severe	
10	N/A	Healthy	$\alpha$ -chymotrypsin Digestion of fresh and OA cartilage
11	N/A	Healthy	
12	N/A	Healthy	
13	N/A	Healthy	
14	N/A	Healthy	
15	N/A	Healthy	
16	N/A	Healthy	
17	N/A	Healthy	
18	N/A	OA Mild	
19	N/A	OA Mild	
20	N/A	OA Mild	
21	N/A	OA Mild	
22	N/A	OA Mild	
23	N/A	OA Mild	
24	N/A	OA Mild	
25	N/A	OA Mild	
26	N/A	OA Moderate	
27	N/A	OA Moderate	
28	N/A	OA Moderate	
29	N/A	OA Moderate	
30	9	OA Severe	

## Results

### *Development of the ELISA C2K77 assay*

The range of the C2K77 ELISA is from 1 to 10000 ng/ml and the absorbance from 0.3 to 2.0 (Fig. 10). The limit of detection was 1 ng/ml and this corresponds to an antibody-peptide binding of approximately 85% (data not shown). The mean ( $\pm$ SD) intra-assay and



inter-assay CV was 8.75% ( $\pm 2.78$ ) and 6.86% ( $\pm 2.51$ ), respectively, in the PBS BSA and 14.56% ( $\pm 6.57$ ) and 12.86% ( $\pm 6.42$ ), respectively, in culture media.

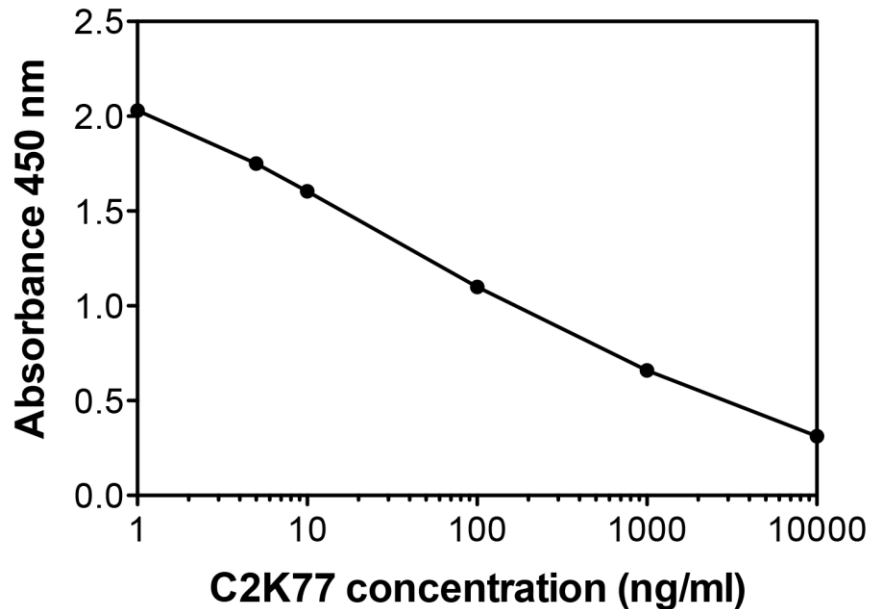


Figure 10. **Standard curve of the ELISA C2K77 assay**

The standard curve was generated with a synthetic C2K77 peptide. Samples were analyzed in triplicate and each point is the mean of the triplicate.

#### *Assessment of C2K77 ELISA*

*Examination of healthy articular cartilage treated with, and without, cathepsin K to generate the type II collagen cleavage neoepitopes:*

Digestion buffers were examined for degradation products released during the incubation with exogenous cathepsin K. A significant increase of C2K77 release was detected at t8 ( $p < 0.01$ ) and t24 h ( $p < 0.01$ ) in the cathepsin K treated group (Fig. 11A) compared with baseline t0. The C2K77 concentration was also higher in the digestion buffer of the cathepsin K digested group at 24 h when compared to the control group ( $p = 0.01$ ; Fig. 11A). The remaining cartilage at 24h was further digested with  $\alpha$ -chymotrypsin. The C2K77 ELISA of the  $\alpha$ -chymotrypsin digests revealed a trend towards an increase in C2K77 measured cathepsin

K activity in the cathepsin K treated cartilage compared to the control group, although not significant (Fig. 11B).

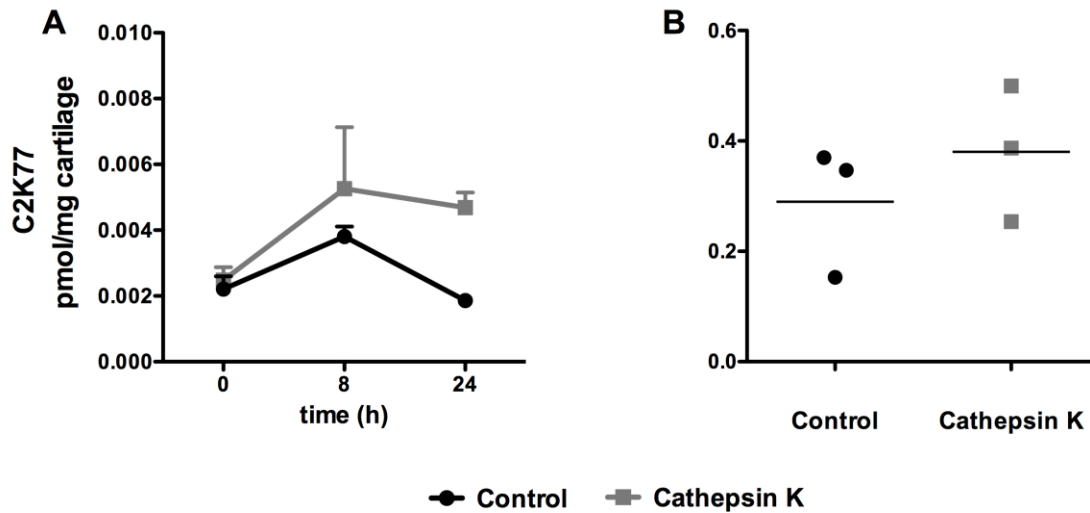
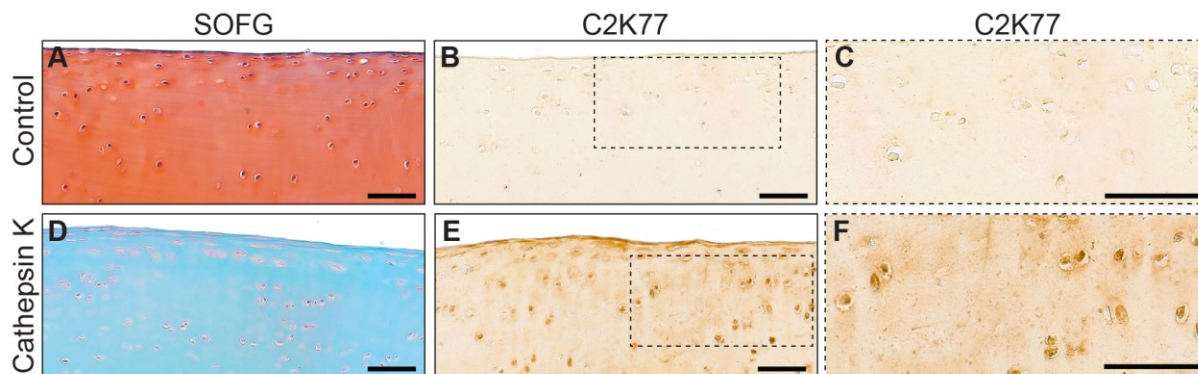


Figure 11. **Equine articular cartilage digested with and without cathepsin K.**

C2K77 release into media and content in cartilage matrix were measured. Fresh articular cartilage was digested with cathepsin K (250 nM) and digestion buffer were collected at time zero, 8 and 24 hrs. The enzyme was inactivated with E-64 and measured with ELISA for C2K77 (A). The cartilage was digested with  $\alpha$ -chymotrypsin overnight at 37°C, the enzyme was inactivated with TPCK, and an ELISA for C2K77 was performed (B). n=3 at 0 and 24 hours and n=2 at 8 hours. \* p=0.01; \*\* p<0.01

*Cathepsin K digestion of healthy articular cartilage: Loss of proteoglycan revealed by Safranin O histology and in situ cleavage of type II collagen by cathepsin K detected by C2K77 immunohistochemistry:*

In the healthy control cartilage, there was good, even, extracellular matrix staining with the Safranin O (Fig. 12A) and absence of immunostaining with the C2K77 antibody (Fig. 12C, E). In contrast, cartilage matrix, following degradation by cathepsin K, exhibited a loss of Safranin O stain due to proteoglycan digestion and release (Fig. 12B). There was greater immunostain uptake in pericellular sites (Fig. 12F) and increased staining with C2K77 at the periphery of some specimens exposed to cathepsin K (Fig. 12D). Some chondrocytes also had enhanced uptake of stain.



**Figure 12. In situ depletion of proteoglycan and cleavage of type II collagen by cathepsin K**

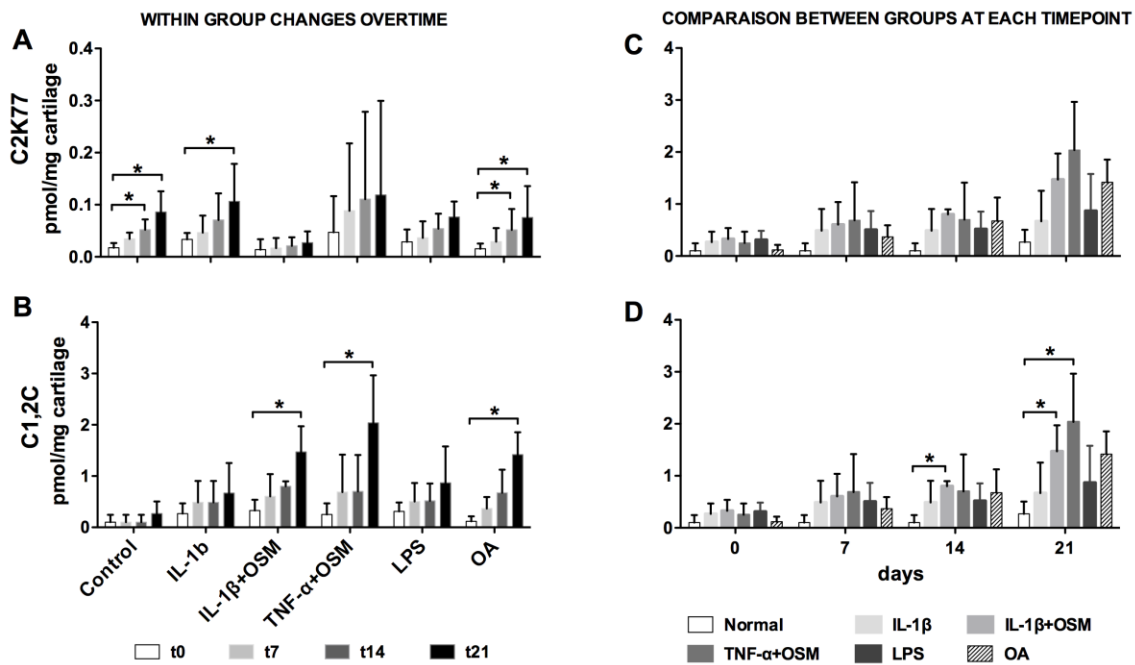
Articular cartilage was stained with Safranin-0 and Fast Green for proteoglycan (A) or with C2K77 antibody for collagen degradation (B, C). After 24 hrs digestion with cathepsin K (250 nM), the cartilage was stained with Safranin-0 and Fast Green (D) or with C2K77 antibody (E, F). The edge of the cartilage were exposed to cathepsin K digestion. Magnification of the areas indicated are shown in E and F. Scale = 100  $\mu$ m

*Influence of cytokines and LPS on cleavage by cathepsin K in cultured healthy equine cartilage explants compared to endogenous non-stimulated cathepsin K type II collagen cleavage in OA explants: detection of cathepsin K (C2K77) and matrix metalloproteinase (MMP) collagenase (C1,2C) activity with ELISA:*

*C2K77 neoepitope release into culture media over time:* An increased media concentration of the C2K77 neoepitope was measured at both t14 and t21 in control ( $p=0.003$  and  $p=0.0001$ ) and OA ( $p=0.003$  and  $p=0.0005$ ) groups compared to t0 (Fig. 13A). IL-1 $\beta$  alone, of all the stimuli, significantly increased C2K77 neoepitope release from healthy explants ( $p=0.0002$ ; Fig. 13A) at t21 compared to t0. However, when compared with the untreated control group at the same time points no differences were detected. Thus, there were no significant increases of C2K77 release when the cartilage was cultured with either the IL-1 $\beta$  and OSM or TNF- $\alpha$  and OSM combinations or LPS alone compared with to or to the unstimulated control groups at each time point.

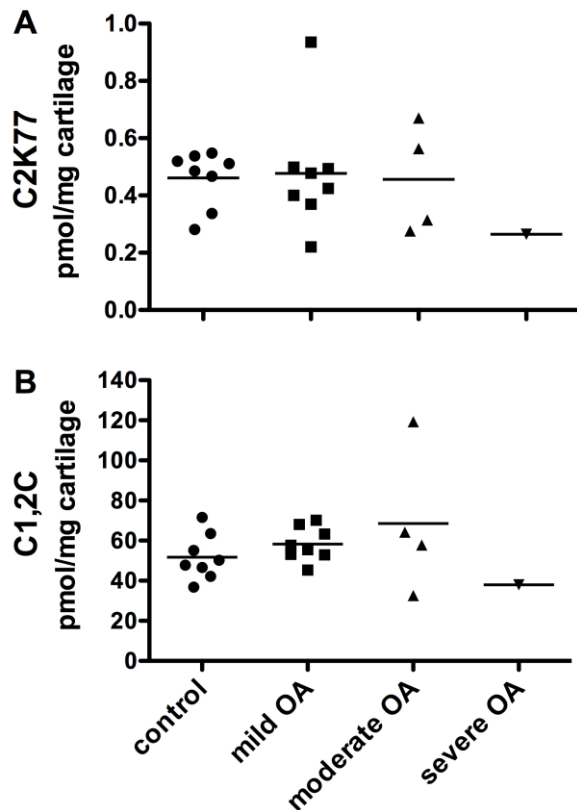
There was no significant increase of C1,2C in the control group media over time compared with t0. Significant increases in the C1,2C neoepitope were observed at t21

compared to t0 control cartilage with the combination of cytokines IL-1 $\beta$  and OSM ( $p=0.002$ ), TNF- $\alpha$  and OSM ( $p<0.0001$ ) and also in the OA group ( $p=0.002$ ) (Fig. 13B). The addition of IL-1 $\beta$  alone or LPS did not significantly increase C1,2C neopeptide content in the media compared with t0 values. An increased concentration of C1,2C neopeptide was also measured at t14 ( $p=0.001$ ) and t21 ( $p=0.002$ ) in the IL-1 $\beta$  and OSM group compared to the unstimulated control group at the same time point (Fig. 13D). C1,2C was also significantly increased ( $p=0.0004$ ) in media of the TNF- $\alpha$  and OSM stimulated group compared with the control group, at t21 (Fig. 13D).



**Figure 13. Influence of cytokines and LPS on cleavage by cathepsin K in cultured healthy equine cartilage explants compared to endogenous non-stimulated cathepsin K type II collagen cleavage in OA explants: detection of cathepsin K (C2K77) and matrix metalloproteinase (MMP) collagenase (C1,2C) activity with ELISA**

Articular cartilages were cultured with cytokines or LPS for 21 days. Media were collected and replenished every 7 days. They were analyzed by ELISA for C2K77 (A,C) and for C1,2C (B,D) contents. \*:  $p \leq 0.003$



**Figure 14. Comparison of cathepsin K (C2K77) and MMP collagenase (C1,2C) activity in freshly isolated normal and OA articular cartilages**

Articular cartilage was digested with  $\alpha$ -chymotrypsin overnight at 37°C. After inhibition of the enzyme with TCPK, the C2K77 and C1,2C contents were assessed by ELISA

*Comparison of cathepsin K (C2K77) and MMP collagenase (C1,2C) activity in freshly isolated normal and OA articular cartilages*

When freshly harvested cartilage was digested with  $\alpha$ -chymotrypsin overnight at 37°C to analyse for C2K77 and C1,2C neopeptide contents in the cartilage matrix, there was no significant difference in the C2K77 and C1,2C contents between the control and OA groups. On a molar basis, the concentration of C2K77 is approximately 0.5 pmol/mg of cartilage (except for severe OA) and the concentration of C1,2C is approximately 60 pmol/mg of cartilage (except for severe OA). Thus, C1,2C content on a cleavage neopeptide pmol basis is approximately 120 fold higher than C2K77 for healthy, mild and moderate OA (Fig. 14). The

concentrations of C2K77 are similar in the control, mild and moderate OA group while C1,2C content is increased in mild and moderate group but the differences are not significant.

## **Discussion**

The digestion of normal equine cartilage by cathepsin K released specific neoepitope-containing cleavage fragments that were measurable (range 0.002 to 0.005 pmol/mg of cartilage) by our novel C2K77 ELISA. The concentrations of cathepsin K-generated fragments reported earlier with another assay (C2K) for a different cathepsin K-generated collagen neoepitope in human cartilage samples were higher (0 to 3.5 pmol/mg of cartilage)(111) . The differences may reflect species differences related to enzymatic activity, be it enzyme expression, substrate structural differences or access and/or other reasons. The novel C2K77 ELISA assay had a concentration range of 1 to 10,000 ng/ml (1.4 to 14,000 nM) similar to that recently reported for the measurement of fragments from cathepsin K digested human cartilage (0.1 to 10,000 nM)(11). The C2K ELISA, developed specifically for human tissues, had a range of 0.5 to 1,000 nM(5) but did not recognize a neoepitope in equine cartilage digested with cathepsin K (unpublished data). Furthermore, the human C2K ELISA measures a C-terminal epitope generated by cathepsin K cleavage of type II collagen(5). The equine C2K77 ELISA assay, in the present study, is based on an antibody directed to a different cleavage site, the most N-terminal cathepsin K cleavage site of equine type II collagen(11), located three residues before the cleavage position first described by Kafienah et al(8) in human and bovine cartilage. Based on sequence data, cathepsin K may generate the same neoepitope in type I collagen, although type 1 collagen is absent in any significant amount from healthy and early OA cartilage and hence this does not invalidate the reported data. The C2K77 ELISA, on the other hand is specific for cathepsin K type II collagen cleavage. Combined, these investigations reveal that it is now possible to measure cathepsin K degradation of equine type II collagen of articular cartilage with an ELISA.

When compared with other commercially available assays that measure type II collagen degradation by MMPs the range of the C2K77 assay is similar to that of C1,2C (range 30 to 10,000 ng/ml: IBEX Technologies Inc.) but greater than either C2C (10 to 1,000

ng/ml; IBEX Technologies Inc.) or the C-terminal telopeptide of type II collagen (CTX-II) in serum (30 to 400 pg/ml; Nordic Bioscience)(161). The intra- and inter-assay CVs of C2K77 were less than 10% in the PBS, 1% BSA matrix and increased to less than 15% in the culture media. CV% of 10-15% are acceptable performance targets for ELISA development(156, 162, 163).

Immunohistochemical staining of the digested cartilage with the C2K77 antibody further confirmed that type II collagen in the extracellular matrix of equine articular cartilage was digested by exposure to exogenous cathepsin K. In some specimens, an increased staining was observed in pericellular site and in chondrocytes periphery of the explants that would have been exposed to the greatest concentrations of cathepsin K and it was also stronger in pericellular sites. As the cartilage employed in these studies was from adult horses, it suggests that type II collagen, remote from chondrocytes, may be more resistant to cathepsin K enzyme cleavage. This could result from increased cross-linking in older collagen or post-translational changes, such as glycation, that modify collagen or mask it and may make it more resistant to cleavage but this requires further study(164).

The progressive increase in cathepsin K mediated degradation of type II collagen observed in healthy normal appearing cartilage, cultured without a stimulant over time, was surprising. It may point to a previously unreported constant background turnover of type II collagen by cathepsin K in normal healthy cartilage. Yet none of the MMP stimulants we assessed in this study had the capacity to upregulate endogenous cathepsin K activity measured by the C2K77 assay in this system *in vitro*. Although IL-1 $\beta$  increased C2K77 levels at day 21 compared to day zero, there was no significant difference when it was compared with the day 21 control unstimulated cartilage.

The exact mechanisms for the increased expression and activity of equine articular cartilage cathepsin K *in vivo* remain to be determined. Previous investigations have reported an upregulated cathepsin K gene expression following stimulation with proinflammatory molecules that we used. Kozawa et al(96) observed an upregulation of cathepsin K mRNA expression in human cartilage explants exposed to IL-1 $\beta$  (0.01-10 ng/ml) for 6 hours, an earlier time point than those we studied, and in a dose-dependent manner. Cathepsin K mRNA expression was also upregulated by the addition of LPS (1 $\mu$ g/ml) to human foetal lung fibroblast cell lines(165). As our assay detects the end products of cathepsin K enzyme activity

on type II collagen it the lack of upregulation we observed raises the question as to whether increased cellular gene expression reported by others on exposure to proinflammatory stimuli results in increased translation of the enzyme and an increase in its extracellular activity that we have measured.

Others have suggested that the cathepsin K can be upregulated by biomechanical stimuli. This would be relevant to articular cartilage studies and, together with analyses of gene expression versus enzymatic activity, should be investigated. Shear stress increases endothelial cell cathepsin K mRNA expression in the murine aorta and is believed to have an important role in remodelling in atherosclerosis(166). This suggests that cathepsin K activity may be upregulated by mechanobiological signals *in vivo*, and these mechanisms would be particularly relevant to the collagen network and articular cartilage. Further studies investigating the effects of stimuli such as sheer stress and compression of cartilage explants on the activity of cathepsin K should reveal whether mechanobiological activation of cathepsin K activity also occurs in articular cartilage

We compared endogenous cathepsin K cleavage of type II collagen in the same cartilage explants to MMP collagenase activity, well known to be increased in OA(13, 14, 167), using the C1,2C assay. This is an ELISA that measures the carboxy terminus neoepitope of the  $\frac{3}{4}$  piece generated by the cleavage of type II collagen by collagenases(14). Whereas collagen degradation by cathepsin K measured by C2K77 was not upregulated by any of the exogenous stimuli investigated, MMP mediated type II collagen cleavage, measured by the C1,2C assay, was upregulated by the combination of TNF- $\alpha$  and OSM or IL-1 $\beta$  and OSM, but not by IL-1 $\beta$  or LPS alone. The combination of TNF- $\alpha$  and OSM was the most potent stimulator of MMP activity as measured by C1,2C release into the media in the present experiment employing equine articular cartilage explants. These results agree with Hui et al(168) who reported that bovine chondrocytes cultured with TNF- $\alpha$  and OSM (2, 5 or 10 ng/ml) for 24 h had an upregulated MMP 1 mRNA expression. Also, the collagen percentage release increased in bovine cartilage explants stimulated with TNF- $\alpha$  and OSM for 14 days(168) similar to the present results for equine cartilage explants. The combination of IL-1 $\beta$  and OSM has also been reported to upregulate gene expression of collagenase MMP 1, 3, 8, 10, 13 when stimulated for 72 h(169) in agreement with our results.



IL-1 $\beta$ , known to increase MMP 3 and 13 mRNA levels in stimulated human and porcine chondrocytes(170, 171), did not increase MMP collagenase activity in the present study. Little et al(172) stimulated equine articular cartilage explants with IL-1 $\beta$  alone and combined with OSM for 28 days and observed a greater hydroxyproline release with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) alone in contrast to our results. We employed a similar concentration of IL-1 $\beta$  but less OSM (10 ng/ml vs 50 ng/ml)(173). Furthermore, cartilage explants from the carpal bones were investigated whereas cartilage explants from the metacarpophalangeal joint were employed in the present study. The divergence of results could also, in part, be explained by a recognised difference in cartilage metabolism and cytokine responses from different anatomical joints(174).

It is clear from the results of this investigation that the mechanisms that activate cathepsin K or MMPs in articular cartilage are different. Cathepsin K appears to exhibit a relatively small but constant background activity in control healthy cartilage compared to MMPs which are also clearly upregulated by pro-inflammatory cytokines in many species.

Neither MMP collagenase nor cathepsin K activity changed from normal to OA. Because the C1,2C content is over 100 fold higher in cartilage than C2K77, MMPs that digest type II collagen would appear to display much greater activity than cathepsin K. Taken together, these results suggest that cathepsin K may be more involved in the physiological turnover of cartilage in equine articular cartilage. Further investigations are required to better understand the control of and role of cathepsin K activity in type II collagen degradation in equine cartilage and equine OA pathology.

In our studies of equine OA, the small number of samples of more severe OA prevents a clear determination of whether cathepsin K activity is enhanced. Earlier studies of equine OA with immunohistochemistry using the C2K antibody(10) revealed an increase in cathepsin K cleavage, as seen with similar technology in human OA(5, 111, 174). It is possible that the C2K77 neopeptide may be degraded by other enzymes preventing an accurate estimation of enzyme activity.

Thus, we recognize that our study has limitations. We require analyses of gene expression alongside analyses by immunoassay of enzyme concentration in addition to measurements of enzyme activity as we have used here. For this initial validation of the C2K77 ELISA assay we elected to investigate its performance in culture media and in digests

of articular cartilage. Additional experiments involving immunoassays using C2K77 will be required in the more challenging matrix of body fluids such as synovial fluid from normal and OA joints, serum and urine. It remains to be determined whether the low molar concentrations of this neoepitope present in equine articular cartilages will be detectable *in vivo* in synovial and other body fluids. The fact that type II collagen peptides are concentrated in urine(175) may facilitate their measurement. A comparison with the neoepitope C2K assay(5) in cartilage and its release from explants thereof in culture media to C2K77 content and release would be also provide additional valuable insight so that release patterns for the N-terminal and C-terminal neoepitopes can be established.

In summary cathepsin K activity is measurable by a novel cathepsin specific cleavage site ELISA and its activity and regulation are clearly different from the MMP collagenases measured by the C1,2C assay.

## Supplementary information for online (to accompany manuscript)

### Supplementary Methods:

#### Development of competitive C2K77 ELISA

*Antibody C2K77:* The anti-neoepitope (C2K77) antibody was produced by immunizing rabbits with a synthetic peptide that includes the equine type II collagen cleavage neoepitope generated by cathepsin K(11). Briefly, equine type II collagen was digested with cathepsin K and the cleavage products that resulted were then characterized by mass spectrometry. A type II collagen peptide, KPGKSGGC (C2K77), containing the most *N*-terminal cleavage product, was coupled to keyhole-limpet hemocyanin (KLH), a carrier protein, for immunization. The resulting antiserum was affinity purified with the immunizing peptide (C2K77) immobilized on a Sulfolink (Pierce) resin(11). The C2K77 immunizing peptide and the purified antibody were titrated to attain the optimal operational concentrations for establishment of the C2K77 ELISA.

#### C2K77 ELISA:

Microlon 600 plates (Greiner Bio-one, USA) were coated with the peptide, described above, diluted in Phosphate buffer solution (PBS) (12.5 ng/100  $\mu$ l). Following overnight incubation at 4° C, the plates were triple washed in a microplate washer (Auto strip washer ELx50; BioTek instruments, VT, USA) with PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) and the unabsorbed sites were subsequently blocked by adding PBS (300  $\mu$ l/well) containing 1% of bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature.

For the standard curve, serial dilutions (1-10,000 ng/ml) of the C2K77 peptide were made in PBS containing 1% of BSA (lyophilized powder,  $\geq$ 98% pure, Sigma-Aldrich). Then 50  $\mu$ l of serial dilutions and 50  $\mu$ l of samples were added to 96 well, round-bottomed, polypropylene plates (Thermo Fisher scientific), employed as a pre-incubation plate. The

rabbit C2K77 antiserum was then diluted 1:400 in PBS-1%BSA and 50 µl was added to each well of the plate. After a 1h incubation/agitation, 80 µl from each well was transferred to each well of the coated Mircolon 600 plates. They were then incubated and agitated for 30 mins in a plate shaker (Labline instruments) and washed (6x) with PBS-T. Goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) (Thermo Fisher Scientific), diluted 1:800 in PBS-1%BSA, was then added (100 µl) to each well. Following an additional incubation/agitation for 30 mins, the plate was washed as described previously but with PBS alone. Tetramethylbenzidine (TMB) (0.4 mg/ml) with 0.02% hydrogen peroxide in citric acid buffer (Thermo Fisher Scientific) was added (100 µl per well). Plates were incubated for a further 15-30 mins with agitation and the reaction was stopped by adding 4N (2 M) sulfuric acid (100 µl/well). The absorbance of each well was read at 450 nm on a microplate spectrophotometer (Bio-Tek instruments Inc, VT, USA). Unless otherwise stated incubations were at room temperature.

#### C2K77 ELISA validation

The precision of the range chosen for the immunoassay was examined by plotting the percentage CV against the concentration of the standard samples. Sensitivity of the assay was assessed by examining the percentage of antigen-antibody binding to determine the smallest measurable change in slope dose-response curve(176). Reproducibility was performed by calculation of the coefficient of variation (CV) for measurements within the same plate and between plates (intra- and inter-assay variation)(156).

#### Harvest Equine articular cartilage

The joints were opened (aseptically for culture experiments) and the articular cartilage was inspected macroscopically as to whether it was normal, fibrillated or exhibited erosions. A digital image of the articular surfaces and a manual map of the sampled sites were recorded for future reference. Full depth articular cartilage was shaved off with a no.10 scalpel blade and immediately stored in preservative-free PBS at 4°C if used within 8 h or stored at -20°C until subsequent analysis.

### Digestion of healthy cartilage with cathepsin K

*C2K77 content in the digestion buffer following digestion of normal cartilage with cathepsin K:*

Healthy equine cartilage (specimen nos. 1-3; Table 1) was chopped into small pieces (2x3 mm<sup>3</sup>: 60 mg approximately) and placed in Eppendorf tubes containing PBS. The cartilage pieces were then incubated in 2 ml of digestion buffer (50 mM sodium acetate buffer pH 5.5, 2 mM dithiothreitol (DTT), and chondroitin-4 sulfate (0.15%)(Sigma-Aldrich) at 32°C and agitated for 24 hrs with 250 nM recombinant human cathepsin K (personal communication Alex Emmott). Aliquots (200 µl) of the digestion buffer were harvested at times (t) 0, 8 and 24 h. Trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) at a final concentration of 12.5 µM was immediately added to each aliquot to inhibit cathepsin K activity.

On termination of the cathepsin K and control digestions, the cartilage was collected, blotted dry, weighed and stored at -20 °C. In order to solubilize the C2K77 neoepitopes in the cartilage matrix, similar to previous studies(5), a part of the remaining cartilage was digested with 1 ml of α-chymotrypsin (Type II from bovine pancreas; Sigma Aldrich; (1mg/ml)) containing 5 µl of 1 mM EDTA, 5 µl of 1 mM iodoacetamide and 5 µl of 10 µg/ml pepstatin A and agitated overnight at 37°C. The α-chymotrypsin activity was then inhibited by the addition of 20 µl of 8mg/ml of methanol of N-tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl ketone (TPCK) for 20 min and the samples were centrifuged at 8000 g for 5 min in a Sorvall Legend microcentrifuge (Thermo Fisher Scientific).

### Histology and C2K77 immunohistochemistry

Samples from control and cathepsin K treated cartilage, before the chymotrypsin digestion step described above, were harvested and fixed in 10% formalin for 24h and then embedded in paraffin. Five-µm thick sections were then cut and stained with Safranin-O and Fast-Green (SOFG) to assess proteoglycan content and also immunostained for C2K77. For the latter, the permeability of the cartilage matrix of the sections was enhanced by treating the

sections with 1% hyaluronidase (type 1-S from bovine testes; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in PBS for 30 min at 37°C to remove glycosaminoglycans. All subsequent incubations were at room temperature. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with freshly prepared 3% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absolute methanol for 5 min followed by washing in PBS (3 × 5 mins). Unreactive aldehyde groups were blocked with 10% v/v normal goat serum in PBS, 1% w/v BSA for 30 min. The sections were then incubated overnight with rabbit antiserum raised to C2K77 diluted 1:500 in PBS and 1% w/v BSA. The secondary antibody consisted of a biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G (1.4 mg/ml diluted 1:200 in PBS 1% w/v BSA; Thermo Scientific, Illinois, USA). After 1hr incubation with the secondary antibody, the sections were washed in PBS (3 times for 5 mins) and further incubated for 45 mins with the avidin-biotin complex labelled with peroxidase (Vector laboratories, California, USA). The peroxidase reaction was terminated by an 8 min incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Vector laboratories, California, USA). After washing, the tissue sections were mounted with VectaMount mounting medium (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada). Negative control sections were incubated under the same conditions but with non-immune rabbit serum.

All histological and immunostained sections were then examined and digitalized with a microscope (x10 objective; Leica DM4000B, Wetzlar, Allemagne) and a Prosilica GT camera (Stadtra, Germany).

#### Cartilage explant culture

*Cartilage isolation and culture:* Full depth articular cartilage was harvested under aseptic conditions from healthy equine MCP joints (n = 3) (specimens 4-6, Table 1) and from joints with macroscopic evidence of OA (n=3) (specimens 7-9, Table 1). The cartilage (600-900 mg) was placed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen Canada Inc.) containing antibiotics/anti-mycotic agents (Penicillin 385.6 units/ml, streptomycin 385.6 µg/ml and Amphotericin 0.963 µg/ml) for 30 mins at 37°. Two additional washing steps, 15 min per washing, were performed with 30 ml of DMEM containing antibiotics/anti-mycotic. The cartilage was then chopped into approximately 2 x 3 mm<sup>3</sup> explants and again washed. The cartilage was weighed and 50-70 mg was randomly placed into each well of a 24-well

tissue culture plates containing 1 ml of DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS). The cartilage explants were pre-cultured for 2 days at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>/95% air. The explants were cultured in 24 well plates and four wells were used per stimulation, whenever sufficient tissue was available. To simulate inflammatory stimuli encountered in joint disease, the wells contained IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) (Kingfisher Biothech USA); IL-1 $\beta$  and OSM (1 ng/ml and 10 ng/ml, respectively) (OSM: Prepotech, USA); TNF- $\alpha$  and OSM (10 ng/ml and 10 ng/ml, respectively) (TNF: Preprotech, USA) and LPS (10 ug/ml) (Sigma-Aldrich, USA). Wells without these additives served as controls. The culture media was harvested and replaced every 7 days, up to day 21 and stored in Eppendorf tubes and frozen at -20°C.

## 5. Discussion générale

*Le nouveau dosage immunologique ELISA C2K77 détecte les néo-épitopes générés par le clivage du cartilage normale par la cathepsine K exogène.*

La digestion du cartilage équin normal par la cathepsine K a libéré des fragments de clivage contenant un néo-épitope spécifique qui étaient mesurables (0.002 à 0.005 pmol/mg de cartilage) par notre nouvelle ELISA C2K77. Une augmentation similaire de fragments générés par la cathepsine K a été rapportée par Dejica et al(5) utilisant un dosage immunologique différent (C2K) et des échantillons de cartilage humain, mais les valeurs détectées étaient plus élevées (0 à 3.5 pmol/mg de cartilage). Les divergences peuvent refléter des différences entre les espèces liées à l'activité enzymatique, que ce soit l'expression enzymatique, les différences structurales du substrat ou l'accès au substrat. La divergence dans les données peut aussi être expliquées par la faible concentration de la cathepsine K (250 nmol/L) utilisée dans l'étude présente pour digérer le cartilage articulaire par rapport à 2  $\mu$ mol/L employé dans l'étude de Dejica et al(5). Il est connu qu'une augmentation de la concentration de la cathepsine K augmente la dégradation du collagène de type II(5, 11) et le néo-épitope généré peut avoir été, ensuite, clivé par l'activation de protéases ou de peptidases endogènes.

La nouvelle ELISA C2K77 avait une plage de concentration allant de 1 à 10000 ng/ml (ou 1.4 à 14000 nM) similaire à celle récemment rapportée pour la mesure des fragments provenant de cartilage humain digéré par la cathepsine K (0.1 à 10000 nM)(11). L'ELISA C2K, développée spécifiquement pour les tissus humains, avait une plage de concentration allant de 0.5 à 1000 nM(5). En outre, l'ELISA C2K pour les humains a mesuré l'épitope C-terminal généré par clivage du collagène de type II par la cathepsine K. L'ELISA C2K77 équin utilisée dans la présente étude est basée sur un anticorps dirigé vers un site de clivage différent : le site de clivage le plus près de l'extrémité N-terminale du collagène de type II équin généré par la cathepsine K (11), située trois résidus avant le site de clivage premièrement décrit par Kafienah et al(8) dans le cartilage humain et bovin. De plus, basé sur des données de séquence, la cathepsine K peut générer le même néoépitope dans le collagène de type I, bien que le collagène de type 1 soit absent en quantité significative du cartilage sain et arthrosique (dans le stade précoce) et, par conséquent, cela n'invalide pas les données rapportées. L'ELISA C2K77, d'autre part, est spécifique pour le clivage du collagène de type



II par la cathepsine K. Ensemble, ces études révèlent qu'il est maintenant possible de mesurer la dégradation du collagène de type II venant du cartilage articulaire équin par la cathepsine K avec une ELISA.

De plus, en comparaison avec d'autres dosages immunologiques qui permettent de mesurer la dégradation du collagène de type II, mais par les MMPs, la plage du test C2K77 est similaire à celle de C1,2C (30 à 10 000 ng/ml : IBEX Technologies inc.) mais supérieure à celle de C2C (10 à 1000 ng/ml : IBEX Technologies inc.) ou du C-télopeptide du collagène de type II (CTX-II) dans le sérum (30 à 400 pg/ml : Nordic Bioscience)(161).

Les coefficients de variation (CV) intra et inter-analyse étaient inférieurs à 10 % dans la matrice faite de PBS-1%BSA, mais étaient entre 10 % et 15 % dans le milieu de culture. Les CVs de 10-15% sont des valeurs de cible de rendement acceptables lorsqu'on commence à développer des ELISAs(156, 162, 163).

Les colorations immunohistochimiques du cartilage digéré ont également confirmé que le cartilage articulaire équin a été digéré par la cathepsine K exogène ajoutée. Dans certains spécimens, une coloration accrue a été observée dans le site périécélulaire et dans la périphérie des chondrocytes des explants qui auraient été exposés aux plus grandes concentrations de cathepsine K. Étant donné que le cartilage utilisé dans ces études provient de chevaux adultes, cela suggère que le collagène de type II qui est plus éloigné des chondrocytes serait plus résistant au clivage enzymatique de la cathepsine K chez les chevaux âgés. Cela pourrait être le résultat d'une augmentation de liaison transverse dans l'ancien collagène ou des changements post-traductionnels qui modifient le collagène et pourrait le rendre plus résistant au clivage(164). Des études plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer la réelle cause de cette différence de coloration.

*L'ELISA C2K77 mesure un néo-épitope endogène généré par la cathepsine K dans des explants de cartilage sain lorsqu'ils sont mis en culture avec et sans stimuli potentiels.*

L'augmentation progressive dans la dégradation de la cathepsine K que nous avons observée dans le cartilage d'apparence saine et normale, mis en culture sans stimulant, au fil du temps était surprenante et suggère un fond de dégradation physiologique constant du collagène de type II par la cathepsine K dans le cartilage normal. Cette information n'a jamais été signalée auparavant. Aucun des stimulants que nous avons évalués dans cette étude n'avait

eu la capacité de réguler positivement l'activité de la cathepsine K endogène dans ce système *in vitro*. Bien que l'IL-1 $\beta$  a augmenté le niveau de C2K77 au jour 21 par rapport au jour 0, il n'y avait pas de différence significative lorsqu'il a été comparé au cartilage contrôle non stimulé au jour 21. Par conséquent, les différences observées n'étaient pas supérieures à la dégradation en arrière-plan dans le cartilage normal non stimulé.

Les mécanismes exacts de l'augmentation de l'expression et de l'activité de la cathepsine K *in vivo* demeurent mal compris. Kozawa et al(96) ont observé une régulation positive de l'expression de l'ARNm de la cathepsine K dans des explants de cartilage humain traités avec l'IL-1 $\beta$  (0.01-10 ng/ml) pendant 6 h, une période de temps plus tôt que notre étude, et d'une manière dose-dépendante. L'expression de l'ARNm de la cathepsine K a aussi été augmentée par l'addition de LPS (1 $\mu$ g/ml) à des lignées cellulaires de fibroblaste pulmonaires de fœtus humain(165). Ces expériences pourraient s'opposer à nos résultats, toutefois, l'expression d'un gène ne se traduit pas nécessairement par l'augmentation de l'activité. Des études analysant la corrélation entre l'expression génique de la cathepsine K et son activité seraient nécessaires afin de conclure qu'un facteur amène à l'autre.

C'est intrigant que la force de cisaillement augmente l'expression endothéliale de la cathepsine K dans l'aorte murine où elle est censée avoir un rôle important dans le remodelage dans l'athérosclérose(166). Ceci suggère que l'activité de la cathepsine K pourrait être régulée positivement par des signaux mécanobiologiques *in vivo*, et il serait particulièrement pertinent au réseau de collagène et au cartilage articulaire. D'autres études portant sur les effets des stimuli tels que la force de cisaillement et la compression des explants de cartilage pourraient aider à comprendre si l'activation mécanobiologique de la cathepsine K se produit dans le cartilage articulaire.

*L'ELISA C1,2C mesure une libération significative des néo-épitopes des collagénase MMPs suivant les stimuli avec la combinaison de cytokines (OSM avec l'IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ ).*

Nous avons également comparé le clivage du collagène de type II par la cathepsine K endogène, dans le même explant de cartilage, avec l'activité des collagénases de la famille des MMPs, qui sont bien connues pour être augmentés dans l'OA(13, 14, 167). C1,2C, une ELISA qui mesure le néo-épitope de l'extrémité C-terminale du fragment  $\frac{3}{4}$  généré par le clivage du collagène de type II par les collagénases(14), a été employé à cet effet. Alors que la

dégradation du collagène par la cathepsine K, mesurée par C2K77, n'a pas été régulée positivement par aucun des stimulants exogènes étudiés, la dégradation des MMPs, mesurée par C1,2C, a été augmentée par la combinaison du TNF- $\alpha$  et de l'OSM ou de l'IL-1 $\beta$  et de l'OSM, mais par l'IL-1 $\beta$  ou le LPS seul.

Le TNF- $\alpha$  et l'OSM combinée ont été les stimulants les plus puissants de l'activité des MMPs telle que mesuré par la libération de C1,2C dans le milieu de culture dans la présente expérience utilisant les explants de cartilage équin. Ces résultats concordent avec ceux de Hui et al(168) qui ont rapporté que les chondrocytes bovins mis en culture avec le TNF- $\alpha$  et l'OSM (2, 5 ou 10 ng/ml) pendant 24 h démontraient une augmentation de l'expression de l'ARNm du MMP1. Également, le pourcentage de relâche du collagène avait augmenté dans les explants de cartilage articulaire bovin stimulé avec le TNF- $\alpha$  et l'OSM pendant 14 jours(168), similaire aux résultats obtenus pour les explants de cartilage équin à l'étude présente. La combinaison de l'IL-1 $\beta$  et de l'OSM a également été signalée comme régulant positivement l'expression des gènes des MMPs 1, 3, 8, 10, 13 lorsque les chondrocytes sont stimulés pendant 72 h(169), ce qui est en accord avec nos résultats.

Étonnamment, IL-1 $\beta$ , connu pour augmenter les niveaux de l'ARNm MMP 3 et 13 dans les chondrocytes humains et porcins stimulés(170, 171), n'a pas augmenté l'activité des collagénases MMPs dans l'étude présente. Little et al(173) ont stimulé des explants de cartilage articulaire équin avec l'IL-1 $\beta$  seule et en combinaison avec l'OSM pendant 28 jours et ont observé une plus grande relâche d'hydroxyproline avec l'IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) seule contrairement à nos résultats. Nous avons utilisé une concentration similaire d'IL-1 $\beta$  seule, mais moins d'OSM a été utilisé (10 ng/ml vs 50 ng/ml) lorsqu'il a été combiné avec l'IL-1 $\beta$ (173). De plus, les explants de cartilage venant des os du carpe ont été examinés dans l'étude de Little et al(173) alors que les explants de cartilage de notre étude venaient de l'articulation métacarpophalangienne. La divergence des résultats pourrait être en partie être expliquée par une différence reconnue dans le métabolisme du cartilage et les réponses aux cytokines venant de différentes articulations chez les humains(174).

Il est clair, d'après les résultats de cette étude, que l'activation de la cathepsine K ou des MMPs dans le cartilage articulaire est très différente. La cathepsine K semble avoir une petite, mais constante activité en arrière-plan dans le cartilage sain et normal alors que les

MMPs sont clairement régulés positivement par des cytokines pro-inflammatoires chez de nombreuses espèces.

Ni l'activité des MMPs ou de la cathepsine K n'ont changé lorsqu'on va du cartilage normal à OA. Étant donné que la teneur en C1,2C est plus de 100 fois plus élevée dans le cartilage que C2K77, les MMPs qui digèrent le collagène de type II semblent présenter une activité beaucoup plus grande que la cathepsine K. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que la cathepsine K est impliquée dans le renouvellement physiologique du cartilage dans le cartilage articulaire équin. D'autres recherches sont nécessaires afin de mieux comprendre le contrôle de l'activité et le rôle de la cathepsine K dans la dégradation du collagène de type II dans l'OA pathologique.

*La cathepsine K endogène est mesurable dans la matrice extracellulaire du cartilage contrôlé et OA fraîchement récolté.*

Le C2K77 a mesuré l'activité endogène de la cathepsine K dans la matrice extracellulaire du cartilage équin normal et OA, relâché par la digestion avec chymotrypsine, mais aucune différence significative n'a été détectée. Il est maintenant connu que la cathepsine K coupe successivement le collagène de type II à partir de l'extrémité N-terminale(11). Il est possible qu'il y ait une digestion physiologique du collagène de type II par la cathepsine K qui explique la faible quantité de C2K77 trouvée dans les conditions normales. Dans l'OA humain, l'activité de la cathepsine K est renforcée et favorisée par la baisse du pH(129) et par conséquent dégrade plus de collagène, augmentant l'épitope C-terminal mesuré dans d'autres études(5, 10, 111). Comparée au néo-épitope C1,2C, la concentration plus faible du néo-épitope C2K77 dans le milieu de culture et dans le cartilage ayant l'OA suggère encore que l'activité de la cathepsine K est considérablement réduite par rapport à l'activité des collagénases de la famille des MMPs.

Des études antérieures de l'arthrose équine avec l'immunohistochimie utilisant l'anticorps C2K(10) ont révélé une augmentation du clivage de la cathepsine K, comme on le voit avec une technologie similaire dans l'OA humaine (5, 111, 174). Il est possible que le néoépitope C2K77 puisse être dégradé par d'autres enzymes empêchant ainsi une estimation précise de l'activité enzymatique.

Il est reconnu que notre étude a des limites. Pour la validation initiale du test ELISA C2K77, nous avons choisi d'évaluer la performance de l'ELISA dans le milieu de culture des explants de cartilage et dans le cartilage digéré. Des expériences supplémentaires évaluant sa performance dans les matrices de fluides corporels humains, qui sont plus difficiles à analyser, comme le liquide synovial venant du cartilage normal et OA, le sérum et l'urine, sont requis. Il reste à déterminer si les faibles concentrations molaires du néo-épitope présent dans le cartilage articulaire équin seront détectables *in vivo* dans le liquide synovial et dans d'autres fluides corporels. Le fait que des peptides du collagène de type II sont concentrés dans l'urine(175) pourrait faciliter leur mesure. Une comparaison entre le néo-épitope C2K(5) et le C2K77 dans le cartilage et sa relâche dans le milieu de culture pourrait fournir des informations précieuses supplémentaires. Ainsi, le modèle de libération des extrémités N-terminale et C-terminale pourra être établi.

## Conclusion

Somme toute, l'activité de la cathepsine K est mesurable par la nouvelle ELISA qui est spécifique au site de clivage du collagène de type II équin par la cathepsine K. L'ELISA d'inhibition compétitive que nous avons développée nous a permis de mesurer l'activité de la cathepsine K *in vitro*, qui ne semble pas être régulé par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TFN- $\alpha$ , l'OSM et le LPS. Contrairement à cathepsine K, l'activité des MMPs est régulée positivement par la combinaison de cytokines pro-inflammatoire (l'IL-1 $\beta$  et l'OSM, le TFN- $\alpha$  et l'OSM). De plus, les faibles quantités de C2K77 comparé au C1,2C indiquent que la cathepsine K dégrade moins le collagène de type II que les MMPs. Donc, l'activité et la régulation de la cathepsine K est différentes de celles des MMPs contrairement à que l'on pensait.

## Bibliographie

1. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(8):1077-89.
2. Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Lories RJ, Abramson S, Spector T, Pastoureau P, et al. The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis: opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments? *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(2):336-48.
3. Bian Q, Wang YJ, Liu SF, Li YP. Osteoarthritis: genetic factors, animal models, mechanisms, and therapies. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2012;4:74-100.
4. Chevalier X, Richette P. Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie*. 2005;2(1):41-58.
5. Dejica VM, Mort JS, Laverty S, Percival MD, Antoniou J, Zukor DJ, et al. Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage. *The American journal of pathology*. 2008;173(1):161-9.
6. Poole AR, Nelson F, Dahlberg L, Tchetina E, Kobayashi M, Yasuda T, et al. Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochemical Society symposium*. 2003(70):115-23.
7. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 2001(391 Suppl):S26-33.
8. Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *The Biochemical journal*. 1998;331 ( Pt 3):727-32.
9. Kamiya T, Kobayashi Y, Kanaoka K, Nakashima T, Kato Y, Mizuno A, et al. Fluorescence microscopic demonstration of cathepsin K activity as the major lysosomal cysteine proteinase in osteoclasts. *Journal of biochemistry*. 1998;123(4):752-9.
10. Vinardell T, Dejica V, Poole AR, Mort JS, Richard H, Laverty S. Evidence to suggest that cathepsin K degrades articular cartilage in naturally occurring equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(3):375-83.
11. Mort JS, Beaudry F, Theroux K, Emmott AA, Richard H, Fisher WD, et al. Early cathepsin K degradation of type II collagen in vitro and in vivo in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(8):1461-9.
12. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Wanted--the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage! *British journal of rheumatology*. 1996;35(9):818-20.
13. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(9):2011-9.

14. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(7):1534-45.
15. Guay M. Anatomie fonctionnelle de l'appareil locomoteur : os, articulations, muscles. 3e éd.. ed. Montréal: Montréal : Presses de l'Université de Montréal; 2005.
16. Rouleau A, Collectif QAI. Le visuel du corps humain: Français-anglais: Editions Québec Amérique; 2009.
17. Marieb EN. Human anatomy and physiology. 3rd ed.. ed. Redwood City, Calif. Don Mills, Ont.: Redwood City, Calif. Don Mills, Ont. : Benjamin/Cummings; 1999.
18. Salter RB. Textbook of Disorders and Injuries of the Musculoskeletal System: An Introduction to Orthopaedics, Fractures, and Joint Injuries, Rheumatology, Metabolic Bone Disease, and Rehabilitation: Williams & Wilkins; 1999.
19. William KJ, Krause WJ. Krause's Essential Human Histology for Medical Students: Universal Publishers; 2005.
20. McClatchey KD. Clinical Laboratory Medicine: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
21. Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2012;4(1):15-37.
22. Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012;23 Suppl 8:S847-51.
23. Frontera WR, Silver JK, Rizzo TD. Essentials of Physical Medicine and Rehabilitation: Musculoskeletal Disorders, Pain, and Rehabilitation: Saunders/Elsevier; 2008.
24. Madhero88. synovial joint. Wikipedia, the free encyclopedia; 2010.
25. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health*. 2009;1(6):461-8.
26. Stevens A. Histologie humaine. 2e éd.. ed. Lowe JS, editor. Paris: Paris : De Boeck Université; 1997.
27. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *The American journal of sports medicine*. 2005;33(2):295-306.
28. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Seminars in cell & developmental biology*. 2001;12(2):69-78.
29. Pearle AD. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:516-23.
30. Izadifar Z, Chen X, Kulyk W. Strategic Design and Fabrication of Engineered Scaffolds for Articular Cartilage Repair. *Journal of Functional Biomaterials*. 2012;3(4):799-838.
31. van Weeren PR, de Grauw JC. Pain in osteoarthritis. *The Veterinary clinics of North America Equine practice*. 2010;26(3):619-42.
32. Poole AR. Osteoarthritis as a whole joint disease. *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*. 2012;8(1):4-6.
33. Heinegard D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2011;7(1):50-6.



34. Englund M. Meniscal pathology on MRI increases the risk for both incident and enlarging subchondral bone marrow lesions of the knee: the MOST Study. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1796-802.
35. Punzi L, Galozzi P, Luisetto R, Favero M, Ramonda R, Oliviero F, et al. Post-traumatic arthritis: overview on pathogenic mechanisms and role of inflammation. *RMD open.* 2016;2(2):e000279.
36. Anderson AS, Loeser RF. Why is Osteoarthritis an Age-Related Disease? Best practice & research *Clinical rheumatology.* 2010;24(1):15.
37. Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis and Cartilage.* 1995;3(4):261-7.
38. Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M, et al. Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis and rheumatism.* 2002;46(8):2087-94.
39. Chubinskaya S, Kumar B, Merrihew C, Heretis K, Rueger DC, Kuettner KE. Age-related changes in cartilage endogenous osteogenic protein-1 (OP-1). *Biochimica et biophysica acta.* 2002;1588(2):126-34.
40. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology.* 2011;7(1):33-42.
41. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12 Suppl A:S39-44.
42. Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco FJ. Genetics in Osteoarthritis. *Current Genomics.* 2008;9(8):542-7.
43. McIlwraith CW. 3 - Traumatic Arthritis and Posttraumatic Osteoarthritis in the Horse. *Joint Disease in the Horse (Second Edition).* Edinburgh: W.B. Saunders; 2016. p. 33-48.
44. Scanzello CR. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17:1040-8.
45. de Grauw JC. Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *The Veterinary quarterly.* 2011;31(2):77-86.
46. Martel-Pelletier J. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum.* 1992;35:530-40.
47. Sadouk MB. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Lab Invest.* 1995;73:347-55.
48. Chadjichristos C. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1[beta] down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 2003;278:39762-72.
49. Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP. Interleukin-1[beta] induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology.* 2000;68:144-9.
50. Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis research & therapy.* 2003;5(2):94-103.

51. Danfelter M, Onnerfjord P, Heinegard D. Fragmentation of proteins in cartilage treated with interleukin-1: specific cleavage of type IX collagen by matrix metalloproteinase 13 releases the NC4 domain. *J Biol Chem.* 2007;282:36933-41.
52. Wojdasiewicz P, Poniatowski Ł A, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators of Inflammation.* 2014;2014.
53. Jay GD, Waller KA. The biology of Lubricin: Near frictionless joint motion. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 2014.
54. Poree B. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *J Biol Chem.* 2008;283:4850-65.
55. Goodrich LR, Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. *The Veterinary Journal.* 2006;171(1):51-69.
56. Sanchez C, Deberg MA, Bellahcène A, Castronovo V, Msika P, Delcour JP, et al. Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone. *Arthritis & Rheumatism.* 2008;58(2):442-55.
57. Sanchez C, Gabay O, Salvat C, Henrotin YE, Berenbaum F. Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(4):473-81.
58. Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Expression of vascular endothelial growth factor in normal, osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts. *Clinical and experimental medicine.* 2013;13(1):81-4.
59. Sherwood JC, Bertrand J, Eldridge SE, Dell'Accio F. Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair. *Drug discovery today.* 2014;19(8):1172-7.
60. Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2003;48(12):3442-51.
61. Burgess CM. *Cosmetic Dermatology*: Springer; 2005.
62. Loeser RF. Osteoarthritis year in review 2013: biology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(10):1436-42.
63. Henrotin Y, Pesesse L, Lambert C. Targeting the synovial angiogenesis as a novel treatment approach to osteoarthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease.* 2014;6(1):20-34.
64. Leydet-Quilici H, Le Corroller T, Bouvier C, Giorgi R, Argenson JN, Champsaur P, et al. Advanced hip osteoarthritis: magnetic resonance imaging aspects and histopathology correlations. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2010;18(11):1429-35.
65. Neve A, Cantatore FP, Corrado A, Gaudio A, Ruggieri S, Ribatti D. In vitro and in vivo angiogenic activity of osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts is modulated by VEGF and vitamin D3 treatment. *Regulatory peptides.* 2013;184:81-4.
66. Sulzbacher I. Osteoarthritis: histology and pathogenesis. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946).* 2013;163(9-10):212-9.
67. Kerin A, Patwari P, Kuettner K, Cole A, Grodzinsky A. Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. *CMLS, Cell Mol Life Sci.* 2002;59(1):27-35.

68. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. Instructional course lectures. 2005;54:465-80.
69. Poole A, Kobayashi M, Yasuda T, Laverty S, Mwale F, Kojima T, et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61(Suppl 2):ii78-81.
70. Systems RD. Matrix Metalloproteinases (MMPs) 2016 [Available from: <https://www.rndsistemas.com/resources/articles/matrix-metalloproteinases-mmps>].
71. Judith Farley VCDaJSM. Proteases and cartilage degradation in Osteoarthritis. In: Rothschild BM, editor. *Principles of Osteoarthritis- Its Definition, Character, Derivation and Modality-Related Recognition: InTech*; 2012. p. 399-418.
72. Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TW, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, et al. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(5):694-8.
73. Stremme S, Duerr S, Bau B, Schmid E, Aigner T. MMP-8 is only a minor gene product of human adult articular chondrocytes of the knee. *Clinical and experimental rheumatology*. 2003;21(2):205-9.
74. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(3):761-8.
75. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1824(1):133-45.
76. Clegg PD, Burke RM, Coughlan AR, Riggs CM, Carter SD. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine veterinary journal*. 1997;29(5):335-42.
77. Volk SW, Kapatkin AS, Haskins ME, Walton RM, D'Angelo M. Gelatinase activity in synovial fluid and synovium obtained from healthy and osteoarthritic joints of dogs. *American journal of veterinary research*. 2003;64(10):1225-33.
78. Soder S, Roach HI, Oehler S, Bau B, Haag J, Aigner T. MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. *Clinical and experimental rheumatology*. 2006;24(3):302-4.
79. Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, et al. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1992;66(6):680-90.
80. Flannery CR, Lark MW, Sandy JD. Identification of a stromelysin cleavage site within the interglobular domain of human aggrecan. Evidence for proteolysis at this site in vivo in human articular cartilage. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(2):1008-14.
81. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*. 1990;29(44):10261-70.
82. Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard PM, McKenna L. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(12):2777-89.
83. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications*. 1967;27(2):157-62.
84. Rossi A, Deveraux Q, Turk B, Sali A. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biological chemistry*. 2004;385(5):363-72.

85. Selent J, Kaleta J, Li Z, Lalmanach G, Brömme D. Selective Inhibition of the Collagenase Activity of Cathepsin K. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(22):16492-501.
86. Guncar G, Pungercic G, Klemencic I, Turk V, Turk D. Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *The EMBO journal*. 1999;18(4):793-803.
87. Turk D, Turk B, Turk V. Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: drug discovery targets? *Biochemical Society symposium*. 2003(70):15-30.
88. McGrath ME, Klaus JL, Barnes MG, Bromme D. Crystal structure of human cathepsin K complexed with a potent inhibitor. *Nat Struct Mol Biol*. 1997;4(2):105-9.
89. Lecaille F, Bromme D, Lalmanach G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie*. 2008;90(2):208-26.
90. Lecaille F, Weidauer E, Juliano MA, Bromme D, Lalmanach G. Probing cathepsin K activity with a selective substrate spanning its active site. *The Biochemical journal*. 2003;375(Pt 2):307-12.
91. Alves MF, Puzer L, Cotrin SS, Juliano MA, Juliano L, Bromme D, et al. S3 to S3' subsite specificity of recombinant human cathepsin K and development of selective internally quenched fluorescent substrates. *The Biochemical journal*. 2003;373(Pt 3):981-6.
92. Brömme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S. Human Cathepsin O2, a Matrix Protein-degrading Cysteine Protease Expressed in Osteoclasts: FUNCTIONAL EXPRESSION OF HUMAN CATHEPSIN O2 IN SPODOPTERA FRUGIPERDA AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(4):2126-32.
93. Jaspard E. Les protéases 2013 [Available from: <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/6Proteases/2Proteases/1Proteases.htm>].
94. Zhao Q, Jia Y, Xiao Y. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;380(4):721-3.
95. Ruettger A, Schueler S, Mollenhauer JA, Wiederanders B. Cathepsins B, K, and L are regulated by a defined collagen type II peptide via activation of classical protein kinase C and p38 MAP kinase in articular chondrocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(2):1043-51.
96. Kozawa E, Cheng XW, Urakawa H, Arai E, Yamada Y, Kitamura S, et al. Increased expression and activation of cathepsin K in human osteoarthritic cartilage and synovial tissues. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2016;34(1):127-34.
97. Troen BR. The regulation of cathepsin K gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1068:165-72.
98. Corisdeo S, Gyda M, Zaidi M, Moonga BS, Troen BR. New insights into the regulation of cathepsin K gene expression by osteoprotegerin ligand. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;285(2):335-9.
99. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone*. 2002;30(2):340-6.
100. Komine M, Kukita A, Kukita T, Ogata Y, Hotokebuchi T, Kohashi O. Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone*. 2001;28(5):474-83.

101. Saneshige S, Mano H, Tezuka K, Kakudo S, Mori Y, Honda Y, et al. Retinoic acid directly stimulates osteoclastic bone resorption and gene expression of cathepsin K/OC-2. *The Biochemical journal*. 1995;309 ( Pt 3):721-4.
102. Paul WE. *Fundamental Immunology*: Wolters Kluwer Health; 2012.
103. Xue Y, Cai T, Shi S, Wang W, Zhang Y, Mao T, et al. Clinical and animal research findings in pycnodysostosis and gene mutations of cathepsin K from 1996 to 2011. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:20.
104. Donnarumma M, Regis S, Tappino B, Rosano C, Assereto S, Corsolini F, et al. Molecular analysis and characterization of nine novel CTSK mutations in twelve patients affected by pycnodysostosis. *Mutation in brief #961*. Online. *Human mutation*. 2007;28(5):524.
105. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(9):522-36.
106. Voet D. *Biochimie*. 2e éd.. ed. Voet JG, editor. Bruxelles: Bruxelles : De Boeck; 2005.
107. Stevens A, Lowe J. *Histologie humaine*: De Boeck Supérieur; 1997.
108. Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, et al. The Collagenolytic Activity of Cathepsin K Is Unique among Mammalian Proteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(48):32347-52.
109. Atley LM, Mort JS, Lalumiere M, Eyre DR. Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating by cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone*. 2000;26(3):241-7.
110. Li Z, Hou WS, Escalante-Torres CR, Gelb BD, Bromme D. Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(32):28669-76.
111. Dejica VM, Mort JS, Laverty S, Antoniou J, Zukor DJ, Tanzer M, et al. Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(3):R113.
112. Li Z, Hou WS, Bromme D. Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry*. 2000;39(3):529-36.
113. Hou WS, Li Z, Buttner FH, Bartnik E, Bromme D. Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biological chemistry*. 2003;384(6):891-7.
114. Haeckel C, Krueger S, Buehling F, Broemme D, Franke K, Schuetze A, et al. Expression of cathepsin K in the human embryo and fetus. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1999;216(2):89-95.
115. Bromme D, Okamoto K. Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. 1995;376(6):379-84.
116. Dauth S, Sirbulescu RF, Jordans S, Rehders M, Avena L, Oswald J, et al. Cathepsin K deficiency in mice induces structural and metabolic changes in the central nervous system that are associated with learning and memory deficits. *BMC neuroscience*. 2011;12:74.
117. Bernstein HG, Bukowska A, Dobrowolny H, Bogerts B, Lendeckel U. Cathepsin K and schizophrenia. *Synapse (New York, NY)*. 2007;61(4):252-3.

118. Tepel C, Bromme D, Herzog V, Brix K. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *Journal of cell science*. 2000;113 Pt 24:4487-98.
119. Rapa I, Volante M, Cappia S, Rosas R, Scagliotti GV, Papotti M. Cathepsin K is selectively expressed in the stroma of lung adenocarcinoma but not in bronchioloalveolar carcinoma. A useful marker of invasive growth. *American journal of clinical pathology*. 2006;125(6):847-54.
120. Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Farley D, Wlodarski B, Kokubo T, et al. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer research*. 1997;57(23):5386-90.
121. Herroon MK, Rajagurubandara E, Rudy DL, Chalasani A, Hardaway AL, Podgorski I. Macrophage cathepsin K promotes prostate tumor progression in bone. *Oncogene*. 2013;32(12):1580-93.
122. Quintanilla-Dieck MJ, Codriansky K, Keady M, Bhawan J, Runger TM. Cathepsin K in melanoma invasion. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(9):2281-8.
123. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(3):576-83.
124. Helske S, Syvaranta S, Lindstedt KA, Lappalainen J, Oorni K, Mayranpaa MI, et al. Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(8):1791-8.
125. Lutgens E, Lutgens SP, Faber BC, Heeneman S, Gijbels MM, de Winther MP, et al. Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation*. 2006;113(1):98-107.
126. Chiellini C, Costa M, Novelli SE, Amri EZ, Benzi L, Bertacca A, et al. Identification of cathepsin K as a novel marker of adiposity in white adipose tissue. *Journal of cellular physiology*. 2003;195(2):309-21.
127. Funicello M, Novelli M, Ragni M, Vottari T, Cocuzza C, Soriano-Lopez J, et al. Cathepsin K null mice show reduced adiposity during the rapid accumulation of fat stores. *PloS one*. 2007;2(8):e683.
128. Yang M, Sun J, Zhang T, Liu J, Zhang J, Shi MA, et al. Deficiency and inhibition of cathepsin K reduce body weight gain and increase glucose metabolism in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(12):2202-8.
129. Konttinen YT, Mandelin J, Li TF, Salo J, Lassus J, Liljestrom M, et al. Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(4):953-60.
130. Takahashi D, Iwasaki N, Kon S, Matsui Y, Majima T, Minami A, et al. Down-regulation of cathepsin K in synovium leads to progression of osteoarthritis in rabbits. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(8):2372-80.
131. Hummel KM, Petrow PK, Franz JK, Muller-Ladner U, Aicher WK, Gay RE, et al. Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *The Journal of rheumatology*. 1998;25(10):1887-94.
132. Troen BR. The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug news & perspectives*. 2004;17(1):19-28.

133. Mukherjee K, Chattopadhyay N. Pharmacological inhibition of cathepsin K: A promising novel approach for postmenopausal osteoporosis therapy. *Biochemical pharmacology*. 2016;117:10-9.
134. Stoch SA, Zajic S, Stone JA, Miller DL, van Bortel L, Lasseter KC, et al. Odanacatib, a selective cathepsin K inhibitor to treat osteoporosis: safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics – results from single oral dose studies in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2013;75(5):1240-54.
135. Brömme D. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *2009;18(5):585-600*.
136. Jerome C, Missbach M, Gamse R. Balicatib, a cathepsin K inhibitor, stimulates periosteal bone formation in monkeys. *Osteoporosis International*. 2012;23(1):339-49.
137. Ochi Y, Yamada H, Mori H, Kawada N, Kayasuga R, Nakanishi Y, et al. ONO-5334, a cathepsin K inhibitor, improves bone strength by preferentially increasing cortical bone mass in ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2014;32(6):645-52.
138. Kumar S, Dare L, Vasko-Moser JA, James IE, Blake SM, Rickard DJ, et al. A highly potent inhibitor of cathepsin K (relacatib) reduces biomarkers of bone resorption both in vitro and in an acute model of elevated bone turnover in vivo in monkeys. *Bone*. 2007;40(1):122-31.
139. Connor JR, LePage C, Swift BA, Yamashita D, Bendele AM, Maul D, et al. Protective effects of a cathepsin K inhibitor, SB-553484, in the canine partial medial meniscectomy model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(9):1236-43.
140. Dossetter AG, Beeley H, Bowyer J, Cook CR, Crawford JJ, Finlayson JE, et al. (1R,2R)-N-(1-cyanocyclopropyl)-2-(6-methoxy-1,3,4,5-tetrahydropyrido[4,3-b]indole-2-carbonyl)cyclohexanecarboxamide (AZD4996): a potent and highly selective cathepsin K inhibitor for the treatment of osteoarthritis. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(14):6363-74.
141. Hu P, Chen W, Bao J, Jiang L, Wu L. Cordycepin modulates inflammatory and catabolic gene expression in interleukin-1beta-induced human chondrocytes from advanced-stage osteoarthritis: an in vitro study. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(10):6575-84.
142. Hussein H, Ishihara A, Menendez M, Bertone A. Pharmacokinetics and bone resorption evaluation of a novel Cathepsin K inhibitor (VEL-0230) in healthy adult horses. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2014;37(6):556-64.
143. Demehri S, Guermazi A, Kwok CK. Diagnosis and Longitudinal Assessment of Osteoarthritis: Review of Available Imaging Techniques. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2016;42(4):607-20.
144. Guermazi A, Roemer FW, Hayashi D. Imaging of osteoarthritis: update from a radiological perspective. *Current opinion in rheumatology*. 2011;23(5):484-91.
145. Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, Brandi ML, Bruyere O, Chapurlat R, et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(11):1756-63.
146. Organization WH. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation 2001 [Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>].
147. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Henrotin Y, Lohmander LS, Losina E, et al. OARSI Clinical Trials Recommendations: Soluble biomarker assessments in clinical trials in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(5):686-97.

148. Daghestani HN, Kraus VB. Inflammatory biomarkers in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1890-6.
149. Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, et al. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone*. 2001;29(3):209-15.
150. Poole AR, Ionescu M, Fitzcharles MA, Billingham RC. The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases. *Journal of immunological methods*. 2004;294(1-2):145-53.
151. Rousseau JC, Zhu Y, Miossec P, Vignon E, Sandell LJ, Garnero P, et al. Serum levels of type IIA procollagen amino terminal propeptide (PIIANP) are decreased in patients with knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(6):440-7.
152. King KB, Lindsey CT, Dunn TC, Ries MD, Steinbach LS, Majumdar S. A study of the relationship between molecular biomarkers of joint degeneration and the magnetic resonance-measured characteristics of cartilage in 16 symptomatic knees. *Magnetic resonance imaging*. 2004;22(8):1117-23.
153. Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, Nicamhlaioibh R, Risteli J, Borel O, et al. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(5):859-67.
154. Scientific TF. Thermo Scientific Pierce Assay Development Technical Handbook [Available from: [https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1602127\\_Assay\\_Development\\_Technical\\_Handbook\\_v2\\_INTL.pdf](https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1602127_Assay_Development_Technical_Handbook_v2_INTL.pdf)].
155. Inc Sb. Competitive ELISA: Basic Principles [Available from: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/competitive-elisa>].
156. Crowther JR. *The ELISA Guidebook*: Humana Press; 2000.
157. Crowther JR. *The ELISA Guidebook*: Humana Press; 2001.
158. Owen JA. *Kuby immunology*. Seventh edition.. ed. Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J, editors: New York : W.H. Freeman and Company; 2013.
159. Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*. 2006;2(3):217-35.
160. Bromme D, Panwar P, Turan S. Cathepsin K osteoporosis trials, pycnodysostosis and mouse deficiency models: Commonalities and differences. *Expert opinion on drug discovery*. 2016;11(5):457-72.
161. Duclos ME, Roualdes O, Cararo R, Rousseau JC, Roger T, Hartmann DJ. Significance of the serum CTX-II level in an osteoarthritis animal model: a 5-month longitudinal study. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010;18(11):1467-76.
162. *Guidance for industry Bioanalytical Method Validation*, (2001).
163. Thomsson O, Strom-Holst B, Sjunnesson Y, Bergqvist AS. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay developed for measuring cortisol concentration in human saliva and serum for its applicability to analyze cortisol in pig saliva. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2014;56:55.
164. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(36):21597-602.



165. Hirabara S, Kojima T, Takahashi N, Hanabayashi M, Ishiguro N. Hyaluronan inhibits TLR-4 dependent cathepsin K and matrix metalloproteinase 1 expression in human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;430(2):519-22.
166. Parker I, Roberts LM, Hansen L, Gleason RL, Sutliff RL, Platt MO. Pro-atherogenic shear stress and HIV proteins synergistically upregulate cathepsin K in endothelial cells. *Annals of biomedical engineering*. 2014;42(6):1185-94.
167. Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(1):131-41.
168. Hui W, Rowan AD, Richards CD, Cawston TE. Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor alpha induces cartilage damage and matrix metalloproteinase expression in vitro and in vivo. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(12):3404-18.
169. Barksby HE, Hui W, Wappler I, Peters HH, Milner JM, Richards CD, et al. Interleukin-1 in combination with oncostatin M up-regulates multiple genes in chondrocytes: implications for cartilage destruction and repair. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(2):540-50.
170. Flannery CR, Little CB, Caterson B, Hughes CE. Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1999;18(3):225-37.
171. Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(10):2648-57.
172. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*. 2005;434(7033):648-52.
173. Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Goodship A, Caterson B. Cytokine induced metalloproteinase expression and activity does not correlate with focal susceptibility of articular cartilage to degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(2):162-70.
174. Kuettner KE, Cole AA. Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(2):93-103.
175. Poole AR, Ha N, Bourdon S, Sayre EC, Guermazi A, Cibere J. Ability of a Urine Assay of Type II Collagen Cleavage by Collagenases to Detect Early Onset and Progression of Articular Cartilage Degeneration: Results from a Population-based Cohort Study. *The Journal of rheumatology*. 2016;43(10):1864-70.
176. Deshpande SS. *Enzyme Immunoassays From Concept to Product Development*. 1 ed: Springer US; 1996. XIV, 464 p.