

Université de Montréal

**Implication de la résolvine D1 dans la régulation des processus
inflammatoires et cataboliques au niveau ostéoarticulaire**

Par Houda Abir Benabdoun

Département de pharmacologie et physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade Philosophiae Doctor (PhD)
en pharmacologie

Mai 2019

© **Houda A Benabdoun, 2019**

Université de Montréal
Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

Implication de la résolvine D1 dans la régulation des processus inflammatoires et cataboliques au niveau ostéoarticulaire

Présenté par
Houda Abir Benabdoun

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Pierre Haddad
Président-rapporteur

Mohamed Benderdour
Directeur de recherche

Hassan Fahmi
Codirecteur de recherche

Denis Girard
Membre du jury

John Di Battista
Examineur externe

Résumé

La mise en évidence du caractère actif de la phase de la résolution de l'inflammation a ouvert la porte à de nouveaux paradigmes thérapeutiques pour les maladies inflammatoires. Des paradigmes qui reposent sur l'utilisation de médiateurs actifs ayant le potentiel de promouvoir la résolution de l'inflammation. En d'autres termes, ces médiateurs régulent la réaction inflammatoire, initient la réparation tissulaire et conduisent au retour de l'homéostasie. Parmi ces médiateurs, la résolvine D1 (RvD1) présente des propriétés anti-inflammatoires et pro-résolutives remarquables et ce, dans divers fonctions et tissus de l'organisme. Bien que les effets de la RvD1 aient été bien caractérisés par de nombreuses recherches, son rôle potentiel au niveau ostéoarticulaire demeure peu documenté. Dans cette étude, nous approfondissons les connaissances sur l'effet de la RvD1 dans la protection et la préservation de l'intégrité ostéoarticulaire, en étudiant sa capacité à réguler les principaux facteurs impliqués dans la physiopathologie articulaire. Dans un premier temps, nous avons démontré que la RvD1 est bien présente dans l'environnement articulaire et que ses niveaux sont plus élevés dans le liquide synovial des genoux arthrosiques par rapport aux genoux sains. Ces genoux sont obtenus d'un modèle d'arthrose chez le chien réalisé lors d'une étude antérieure. Par la suite, nous avons étudié ses effets sur les composantes cellulaires de l'articulation. Sur les chondrocytes arthrosiques humains, nous avons démontré que la RvD1 inhibe l'expression des médiateurs inflammatoires et cataboliques induits par l'IL-1 β , à savoir la COX-2, la PGE2, l'iNOS, le NO et la MMP-13. L'étude des voies de signalisation a ensuite révélé que la RvD1 s'oppose à l'activation de NF- κ B / p65, p38 / MAPK et JNK1 / 2, induite par l'IL-1 β . En plus de ces remarquables effets, la RvD1 confère une protection contre l'apoptose cellulaire et le stress oxydatif induits par le HNE, tel que démontré par l'inactivation des caspases, l'inhibition de la libération de la LDH, l'augmentation des taux de la Bcl-2 et de l'AKT, ainsi que la stimulation du GSH. À côté des chondrocytes, la RvD1 a montré des effets puissants sur les ostéoclastes. En effet, elle inhibe la différenciation et l'activation des ostéoclastes tel que démontré par l'inhibition de l'expression de TRAP et de la cathepsine K. Elle réduit l'expression de TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IFN- γ , de la PGE2 et de RANKL, induite par le LPS et augmente celle de l'IL-10. De plus, elle protège contre la résorption de la matrice d'hydroxyapatite ainsi que l'érosion

de la matrice osseuse *ex vivo*, induites par le RANKL et le M-CSF. Enfin, l'étude des propriétés de la RvD1 dans un modèle d'arthrite chez la souris a révélé qu'elle réduit le score clinique, l'inflammation de la patte et la destruction des os et des articulations. De surcroît, elle inhibe les médiateurs inflammatoires et diminue significativement les marqueurs sériques du remodelage osseux et cartilagineux. Nos résultats sont très prometteurs et confirment le potentiel de la RvD1 dans la résolution de l'inflammation et le maintien de l'intégrité articulaires. Ils mettent ainsi en évidence sa pertinence clinique en tant qu'agent actif dans la prise en charge thérapeutique des maladies ostéoarticulaires.

Mots-clés : Inflammation, résolution de l'inflammation, résolvine D1, articulation, catabolisme, résorption osseuse, arthrose, arthrite.

Abstract

The recognition of the proactive character of the resolution phase of inflammation has revealed alternative therapeutic paradigms for inflammatory conditions, based on the use of active mediators capable of promoting the resolution of inflammation. In other words, these mediators regulate the inflammatory response, initiate tissue repair and promote the return to homeostasis. Among them, resolvin D1 (RvD1) has remarkable anti-inflammatory and pro-resolutive properties. Although the effects of RvD1 have been well studied, its potential role in the osteoarticular tissues remains poorly documented. In this study, we expand our understanding of the potential of RvD1 in protecting and preserving joint integrity by studying its ability to regulate the major factors involved in the articular pathophysiology. First, we demonstrated that RvD1 is produced in the articular environment and that its levels are higher in the synovial fluid of osteoarthritic knees compared to healthy knees. The knees were obtained from an osteoarthritic dog model performed in a previous study. Therefore, we studied RvD1 actions on the cellular components of the joint. In human osteoarthritic chondrocytes, we demonstrated that RvD1 inhibits IL-1 β -induced inflammatory and catabolic mediators, namely COX-2, PGE₂, iNOS, NO, and MMP-13. This led to the study of signaling pathways, which revealed that RvD1 counter-regulates IL-1 β -induced activation of NF- κ B / p65, p38 / MAPK and JNK1 / 2. In addition, RvD1 confers a protection against cellular apoptosis and oxidative stress induced by HNE, as revealed by caspases inactivation, LDH inhibition, as well as increased levels of Bcl-2, AKT, and GSH. In addition to chondrocytes, RvD1 showed remarkable effects on osteoclasts. Indeed, it inhibits osteoclast differentiation and activation, as demonstrated by the inhibition of TRAP and cathepsin K expression. Moreover, it reduces LPS-induced TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , PGE₂ as well as RANKL and concurrently increases IL-10 expression. Furthermore, it inhibits RANKL and M-CSF-induced hydroxyapatite matrix degradation and bone matrix erosion, *ex vivo*. Finally, the study of the properties of RvD1 in a mouse model of arthritis, revealed that it alleviates the clinical score, paw inflammation, as well as bone and joint destruction. Furthermore, it reduces the inflammatory mediators and significantly decreases serum markers of bone and cartilage remodeling. Our results are very promising and confirm the high potential of RvD1 in resolving inflammation and preserving

joint integrity. They highlight its clinical relevance as a therapeutic agent for the management of osteoarticular diseases.

Keywords: Inflammation, resolution of inflammation, resolvin D1, joint, catabolism, bone resorption, osteoarthritis, arthritis.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii
Introduction.....	1
SECTION 1 : SYNTHÈSE	3
1. L'inflammation	4
1.1 La réaction inflammatoire aiguë.....	4
1.1.1 Les processus séquentiels de la réaction inflammatoire aiguë.....	4
1.1.1.1 La reconnaissance de l'agent pathogène.....	4
1.1.1.2 Le recrutement, l'adhésion et la transmigraton des leucocytes	6
1.1.1.3 La chimiotaxie, l'activation leucocytaire et l'élimination de l'agent pathogène	6
1.1.1.4 La résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire	7
1.1.2 Les médiateurs solubles de l'inflammation	8
1.1.2.1 Les métabolites de l'acide arachidonique.....	8
1.1.2.2 Les cytokines	11
1.1.2.3 Les autres médiateurs de l'inflammation.....	12
1.2 Les issues possibles de la réaction inflammatoire aiguë.....	14
1.3 L'inflammation chronique	15
2 La résolution de l'inflammation.....	17
2.1 La cascade de la résolution de l'inflammation	18
2.2 La post-résolution	21
2.3 Pro-résolutif versus anti-inflammatoire	21
2.4 Les médiateurs de la résolution de l'inflammation.....	21

2.4.1	Les acides gras oméga-3	22
2.4.2	Les médiateurs spécialisés de pro-résolution.....	23
2.4.2.1	Les effets biologiques des SPM.....	26
3	La résolvine D1.....	29
3.1	La biosynthèse de la RvD1	29
3.1.1	La biosynthèse de la résolvine D1 induite par l'aspirine	30
3.2	Les récepteurs de la RvD1	31
3.2.1	ALX / FPR2	31
3.2.2	GPR32 ou DRV1	32
3.3	Les effets biologiques de la RvD1	34
4	L'inflammation, la résolution de l'inflammation et l'articulation	36
4.1	Structure d'une articulation saine	36
4.1.1	Le cartilage articulaire	37
4.1.1.1	Les chondrocytes	39
4.1.1.2	La matrice extracellulaire	40
4.1.1.3	Le collagène	40
4.1.1.4	Les protéoglycanes.....	40
4.1.2	L'os sous-chondral.....	41
4.1.3	La membrane synoviale	43
4.2	L'homéostasie articulaire.....	44
4.2.1	L'homéostasie du cartilage	44
4.2.2	L'homéostasie de l'os	45
4.3	Les pathologies articulaires.....	47
4.3.1	L'arthrose	47
4.3.1.1	Épidémiologie.....	47
4.3.1.2	Retentissement socio-économique.....	48
4.3.1.3	Facteurs de risque	48
4.3.1.4	Physiopathologie.....	49
4.3.1.5	Inflammation et arthrose.....	49
4.3.1.5.1	Rôle des cytokines pro-inflammatoires.....	50
4.3.1.5.2	Rôle des cytokines anti-inflammatoires	50

4.3.1.5.3	Rôle de la COX-2 et de la PGE2.....	51
4.3.1.5.4	Rôle des MMP.....	51
4.3.1.5.5	Rôle du NO.....	51
4.3.1.5.6	Rôle du stress oxydatif.....	51
4.3.1.6	Prise en charge thérapeutique de l’OA.....	52
4.3.2	L’arthrite rhumatoïde.....	54
4.3.2.1	Épidémiologie.....	54
4.3.2.2	Retentissement socioéconomique.....	54
4.3.2.3	Facteurs de risque.....	54
4.3.2.4	Physiopathologie.....	55
4.3.2.4.1	Rôle des macrophages.....	55
4.3.2.4.2	Rôle des lymphocytes T.....	56
4.3.2.4.3	Rôle des lymphocytes B.....	56
4.3.2.4.4	Rôle des ostéoclastes et de RANKL.....	57
4.3.2.4.5	Rôle des cytokines inflammatoires.....	57
4.3.2.5	Prise en charge thérapeutique de la RA.....	57
4.4	La résolution de l’inflammation et les pathologies articulaires.....	59
	Hypothèses du projet de recherche.....	60
	Objectifs du projet de recherche.....	61
	SECTION 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES.....	62
	Article 1.....	63
	Article 2.....	97
	SECTION 3 : DISCUSSION.....	99
5	Discussion.....	134
5.1	La RvD1 est accumulée dans le liquide synovial et régule l’inflammation et le catabolisme des chondrocytes humains.....	135
5.2	La RvD1 s’oppose au stress oxydatif et à l’apoptose des chondrocytes.....	138
5.3	La RvD1 inhibe l’activation et le recrutement des ostéoclastes <i>in vitro</i> ainsi que la résorption de la matrice d’hydroxyapatite et des explants d’os <i>ex vivo</i>	140
5.4	Les effets de la RvD1 sont médiés par son récepteur ALX/FPR2.....	142

5.5	La RvD1 inhibe l'inflammation et préserve l'intégrité des tissus articulaires <i>in vivo</i>	143
5.6	Perspectives futures	147
5.6.1	Perspectives à court terme	147
5.6.2	Perspectives à long terme.....	147
	Conclusion	148
	Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Médiateurs de l'inflammation et leurs actions biologiques.	13
Tableau II.	Médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation et leurs actions biologiques.....	27
Tableau III.	Stratégies thérapeutiques de l'OA	53
Tableau IV.	Traitements pharmacologiques de la RA	58

Liste des figures

Section 1 : synthèse

Figure 1.	Médiateurs de l'AA et leurs rôles dans l'inflammation.....	10
Figure 2.	Issues de l'inflammation aiguë.	15
Figure 3.	De la réaction inflammatoire aiguë à la résolution de l'inflammation.	20
Figure 4.	Voies de synthèse des SPM à partir de leurs précurseurs.	25
Figure 5.	Épimères S et R de la RvD1.	30
Figure 6.	Récepteurs de la RvD1.....	33
Figure 7.	Structure d'une articulation saine.	37
Figure 8.	Différentes couches du cartilage et de l'os articulaires.	39
Figure 9.	Organisation de la matrice extracellulaire du cartilage.....	41
Figure 10.	Représentation des cellules osseuses.	43
Figure 11.	Mécanismes régulant la formation et la fonction des ostéoclastes.	46

Section 2: articles scientifiques

Article 1

Figure 1.	RvD1 levels are higher in the synovial fluid of OA dogs compared to control animals.....	89
Figure 2.	RvD1 did not impair chondrocytes viability	90
Figure 3.	RvD1 reduced IL-1 β -induced COX-2 expression and PGE2 release.....	91
Figure 4.	RvD1 reduced IL-1 β -induced iNOS expression and NO production.....	92
Figure 5.	RvD1 reduces IL-1 β -induced MMP-13 expression.....	93
Figure 6.	RvD1 inhibited IL-1 β -induced activation of NF- κ B, p38/MAPK and JNK ^{1/2} pathways	94
Figure 7.	RvD1 inhibited HNE-induced caspases activation and LDH release but activated AKT pathway.....	95
Figure 8.	RvD1 increases GSH level in OA chondrocytes activated with 4-HNE	96

Article 2

Figure 1. RvD1 does not impair RAW264.7 cells viability.....	127
Figure 2. RvD1 inhibits osteoclast activation and recruitment as well as LPS-induced TRAP, cathepsin-k, PGE ₂ , TNF- α , and RANK expression, and concurrently enhances IL-10 release in LPS-activated RAW 264.7 macrophages	128
Figure 3. RvD1 inhibits hydroxyapatite matrix degradation as well as bone resorption induced by primary human monocytes-derived osteoclasts.....	129
Figure 4. RvD1 treatment improves RA clinical endpoints as well as synovium and bone changes in arthritic mice	130
Figure 5. RvD1 daily treatment prevents cartilage and bone alterations in arthritic mice joints	131
Figure 6. RvD1 daily treatment decreases inflammatory mediators release in arthritic mice serum.....	132

Liste des sigles

AAC : Alliance de l'Arthrite du Canada

Liste des abréviations

AA : Acide l'arachidonique

ACTH : Hormone adrénocorticotrope

ADAM : *Disintegrin and metalloproteinase*

ADAMT : *ADAM with a Thrombospondin Motifs*

AG ω -3 : Acides gras polyinsaturés oméga 3

AINS : Antiinflammatoires non stéroïdiens

ALX : Récepteur de la lipoxine A4

AnxA1 : Annexine A1

ARMM : Antirhumatismaux modificateurs de la maladie

AT-RvD1 : Isomères de la RvD1 induits par l'aspirine

BLT : récepteur des leucotriènes

BMP : Protéine morphogénétique osseuse

CAIA : Arthrite induite par l'anticorps anti-collagène de type II

CCL2 : *Chemokine ligand 2*

CIA : Arthrite induite par le collagène

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COMP : Protéine matricielle oligomérique du cartilage

COX : Cyclooxygénase

CYP450 : Cytochrome P450

DAMP: *Damage-associated molecular patterns*

DHA : Acide docosahexaénoïque

EPA : Acide eicosapentaénoïque

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

FPR2 : Récepteur formyle peptide 2

FPR2^{-/-} : Ablation des gènes du récepteur FPR2

GCKR : Protéine régulatrice de la glucokinase

GPCR : Récepteurs couplés à la protéine G

GSH : Glutathion réduit

HNE : 4-Hydroxynonéal

HpDHA : *Hydroperoxy-docosahexaénoïque acid*

HDHA : *Hydroxy- docosahexaénoïque acid*

IFN : Interféron

IGF-1 : Facteur de croissance analogue à l'insuline-1

IL : Interleukine

IL-1 β ^{-/-} : Ablation des gènes de l'IL-1 β

IL-1Ra : Antagoniste du récepteur de l'IL-1

iNOS : Monoxyde d'azote synthase inductible

IRF : Facteur de régulation de l'Interféron

JNK : *Jun N-terminal Kinase*

LDH : Lactate déshydrogénase

LOX : Lipoxigénase

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Leucotriène

LX : Lipoxines

MAPK : Protéines kinases activées par les mitogènes

MaR : Maresines

M-CSF : *Macrophage colony stimulating factor*

MCP-1 : Protéine chimio-attractante des monocytes-1

MEC : Matrice extracellulaire MEC

miR : MicroARN

MMP : Métalloprotéinases matricielles

mPGES-1 : PGE synthase-1 microsomale

n-3DPA : n-3 Acide docosapentaénoïque

NETs : Pièges extracellulaires des neutrophiles

NF-κB : Facteur de transcription du facteur nucléaire Kappa B

NO : Monoxyde d'azote

NOS : Espèces réactives du nitrogène

NPD1 : Neuroprotectine D1

Nrf2 : *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2*

OA : Arthrose

OPG : Ostéoprotégérine

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*

PD : Protéines de la série D

PG : Prostaglandines

PLA2 : Phospholipase A2

PMN : Polymorphonucléaires

PRR : *Pattern Recognition Receptors*

PTH : Hormone parathyroïdienne

RA : Arthrite rhumatoïde

RANKL : *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*

RF : Facteur rhumatoïde

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RvE : Résolvines de la série E

RvD : Résolvines de la série D

SAA : Protéine pro-inflammatoire l'amyloïde A sérique

SPM : Médiateurs spécialisés de pro-résolution

TGF- β : Facteur de croissance transformant β

TIMP : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

TRAP : *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*

TRPA1 : *Transient receptor potentiel ankyrin type 1*

TRPV1 : *Transient receptor potentiel vanilloïde type 1*

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

À mes chers parents, ma source d'inspiration...

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche Dr. Mohamed Benderdour pour m'avoir permis de réaliser ce projet et pour m'avoir épaulée, soutenue et appuyée dans toutes mes démarches. Merci pour le professionnalisme et la bienveillance dont vous avez fait preuve à mon égard. Je ne vous ai pas souvent dit à quel point je vous en suis reconnaissante.

Merci à mon codirecteur de recherche, Dr. Hassan Fahmi pour ses précieux conseils qui ont permis de bien faire avancer le projet.

Un merci particulier à Dr. Julio Fernandes qui, malgré un emploi du temps excessivement chargé, a toujours trouvé le moyen de nous en consacrer une partie. Merci pour ton écoute, ta disponibilité et tes conseils précieux.

Mes remerciements sont également adressés à l'ensemble des membres du respectable Jury : Dr. Pierre Haddad, Dr. John Di Battista, Dr. Denis Girard et Dr. Richard Bertrand, qui nous ont fait honneur de consacrer de leur précieux temps à l'examen de notre travail.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire : Patricia, Mouna, Josée et Francis pour leur support, leur disponibilité et leurs conseils, ainsi que les nombreux collègues et amis sans qui mes journées au laboratoire n'auraient pas eu le même sens. Un grand MERCI Merve, Mélanie et Bouchra. MERCI à Samy et Ines pour leur soutien et leur aide.

Merci au FRQ-S, au GRUM et à la ESP de l'université de Montréal pour leur apport financier durant la réalisation de ce projet.

J'aimerais également remercier tous les chirurgiens qui ont pris le temps de prélever et d'envoyer au laboratoire des spécimens essentiels pour nos projets: un geste très apprécié.

MERCI aussi à mes parents: ils m'ont toujours laissé le libre choix dans ma vie, ils m'ont appris très tôt l'ambition et la persévérance pour atteindre mes objectifs.

MERCI à toi Rachid, pour ton appui et ton soutien inconditionnel dans la concrétisation de tous mes projets. Ta compagnie m'a été et me restera toujours d'un suprême apport.

Un MERCI tout spécial à toi ILYAS, tu illumines chaque jour de ma vie. Je t'aimerai toujours.

Introduction

L'inflammation est un processus essentiel et complexe, mettant en jeu des mécanismes immunologiques dynamiques hautement régulés afin de reconnaître, détruire et éliminer tout agent pathogène et ainsi assurer une réponse protectrice adéquate. La facette positive de l'inflammation a cependant son revers. Comme tout processus physiopathologique, la réponse inflammatoire est soumise à une fine régulation quant à son intensité et sa durée. Une réponse inflammatoire aiguë devrait être spontanément résolutive et aboutir au retour de l'homéostasie. En ce sens, différents médiateurs endogènes de pro-résolution sont mis en jeu par l'organisme pour réguler la réponse inflammatoire et assurer le retour à l'homéostasie. Cependant, la résolution physiologique de l'inflammation peut être entravée. L'inflammation devient alors délétère, engendrant des lésions tissulaires, un remodelage structural et potentiellement une perte fonctionnelle. On parle alors d'inflammation persistante ou chronique, un facteur essentiel et commun à la pathogenèse des maladies les plus courantes et les plus difficiles à traiter, telles que l'arthrite rhumatoïde (RA), les maladies inflammatoires de l'intestin et l'asthme, entre autres. Viennent s'ajouter à ces troubles inflammatoires bien caractérisés, de nombreuses autres maladies qui n'étaient pas conventionnellement considérées comme des maladies inflammatoires mais dans lesquelles l'inflammation a un rôle clé. Celles-ci incluent les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, le diabète ou encore l'arthrose (OA).

Une inflammation incontrôlée peut ainsi siéger au niveau de différents organes et fonctions et mener à leur détérioration. Dans l'articulation, ceci résulte en une destruction des tissus articulaires, se traduisant par des douleurs, une raideur, ainsi qu'une perte de la mobilité, tel que constaté dans deux pathologies très invalidantes; l'OA et la RA.

Il est donc d'une importance capitale que le processus inflammatoire soit résolu. Dans cette optique, la résolution de l'inflammation représenterait une nouvelle voie physiopathologique endogène, qui, si ciblée, offrirait des stratégies thérapeutiques novatrices pour le traitement d'un bon nombre de maladies inflammatoires chroniques.

Parmi les médiateurs de pro-résolution, la résolvine D1 (RvD1), s'est démarquée par des propriétés anti-inflammatoires et pro-résolutives dans divers modèles inflammatoires,

notamment au niveau pulmonaire, cardiovasculaire ou encore neurologique. Ses effets ostéoarticulaires sont néanmoins très peu étudiés.

Le but de ce projet de recherche est d'élargir les connaissances sur les effets de la RvD1 dans la résolution de l'inflammation au niveau ostéoarticulaire. Nous nous sommes penchés sur l'étude des effets de ce médiateur sur les différentes structures articulaires avec un regard particulier sur le cartilage et l'os. Nous avons ainsi évalué ses propriétés sur les composantes inflammatoires et cataboliques en étudiant l'inflammation, l'apoptose, le stress oxydatif et le catabolisme du cartilage, de même que la synthèse des cytokines et le recrutement des ostéoclastes, *in vitro*. Nous avons de plus étudié ses actions sur l'érosion de la matrice osseuse *ex vivo*, pour ensuite valider les effets observés dans un modèle d'inflammation *in vivo*.

Le présent travail démontre le rôle actif de la RvD1 sur la protection des tissus articulaires et son potentiel comme agent thérapeutique. Il appuie la notion de la résolution de l'inflammation en tant qu'approche novatrice pour le traitement de l'inflammation articulaire.

Cet ouvrage est constitué de trois sections. En premier lieu, il revoit les différents processus inflammatoires aigu et chronique et expose en détail la notion de la résolution de l'inflammation, en se focalisant spécialement sur la RvD1. Il aborde ensuite la physiologie et physiopathologie articulaire et illustre les concepts décrits en deux pathologies affectant considérablement l'articulation, à savoir, l'OA et la RA. Cette partie, schématisée en quatre chapitres, synthétise la revue de la littérature. Elle est suivie de la présentation de deux articles scientifiques décrivant les effets de la RvD1 au niveau articulaire. Enfin, une dernière section comportant une discussion et une conclusion générale souligne la contribution scientifique de ces travaux et complète ainsi cet ouvrage.

SECTION 1 : SYNTHÈSE

1. L'inflammation

L'inflammation est une réponse physiopathologique de l'organisme vis à vis des perturbations de l'homéostasie. Elle peut être causée par des infections, un traumatisme, une nécrose tissulaire, ou encore une réponse immunitaire inadéquate. Cette réponse peut être auto-limitante aboutissant à la résolution et au retour à l'homéostasie tissulaire, ou au contraire, évoluer vers une inflammation chronique.

Ce premier chapitre décrit brièvement la biologie cellulaire et moléculaire de l'inflammation aiguë, des mécanismes de déclenchement aux mécanismes de réparation tissulaire en passant par les médiateurs et cellules inflammatoires. Il finit avec une courte description de l'inflammation chronique.

1.1 La réaction inflammatoire aiguë

La réponse inflammatoire aiguë repose sur un ensemble d'interactions cellulaires et moléculaires complexes entre le système immunitaire, le système vasculaire et le tissu afin d'éliminer l'agent pathogène. Elle met en jeu de nombreux médiateurs qui peuvent être pro- ou anti-inflammatoires pour entretenir ou alors mettre fin à la réponse inflammatoire.

Quel que soit son siège et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire aiguë présente des mécanismes communs qui peuvent être individualisés de manière schématique, mais sont en réalité très intriqués. Ainsi, la réponse inflammatoire typique se développe à travers un enchaînement séquentiel de plusieurs étapes, à savoir, la reconnaissance de l'agent pathogène, le recrutement des leucocytes, l'élimination de l'agent, la régulation (contrôle) de la réponse et la résolution de l'inflammation conduisant à la restauration de l'homéostasie [1, 2].

1.1.1 Les processus séquentiels de la réaction inflammatoire aiguë

1.1.1.1 La reconnaissance de l'agent pathogène

La reconnaissance du signal de danger par des cellules sentinelles du système immunitaire inné, principalement les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et

les cellules épithéliales, lance le signal de déclenchement. Le système immunitaire inné constitue ainsi une première ligne de défense et joue un rôle de premier plan dans la régulation et l'orientation de la réponse inflammatoire. En effet, grâce à leurs récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptors*), les cellules sentinelles détectent les signaux exogènes d'origine microbienne, appelés PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*), ou endogènes qui font suite à des dommages ou à une nécrose tissulaire; appelés alarmines ou encore DAMP (*damage-associated molecular patterns*). [3-5].

Engagés par les PAMP ou les DAMP, les PRR déclenchent l'initiation de la phase inflammatoire aiguë par la mise en jeu d'une réponse immunitaire dynamique finement orchestrée. Ils activent des voies de signalisation en aval, impliquant notamment le facteur de transcription du facteur nucléaire Kappa B (NF- κ B), les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) ainsi que le facteur de régulation de l'interféron (IRF) [6]. Ceci résulte en l'expression de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires, notamment l'interleukine-1-bêta (IL-1 β), l'IL-6, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), également appelés le trio inflammatoire. Conjointement à des chimiokines et diverses autres molécules de costimulation, telles que l'histamine, la sérotonine, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), les prostaglandines (PG) et les leucotriènes (LT), ces cytokines pro-inflammatoires induisent et régulent la réponse inflammatoire subséquente [7, 8].

Certains médiateurs dérivés du plasma, comme les protéines du complément, sont présents dans la circulation en tant que précurseurs inactifs. Activés par l'agent pathogène qui déclenche une série de clivages protéolytiques, ils acquièrent leurs propriétés biologiques et participent au déclenchement de la cascade inflammatoire [8].

Sous l'influence des médiateurs inflammatoires sécrétés à la suite de la reconnaissance du pathogène, survient une réponse vasculaire locale caractérisée par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Cette dernière est principalement due à la rétraction des cellules endothéliales par l'action de l'histamine, de la bradykinine, des PG et des LT. Ceci mène à une fuite vasculaire et à l'exsudation des protéines plasmatiques et des leucocytes dans l'espace interstitiel. Le tout résultant en l'apparition d'un œdème qui, en comprimant les terminaisons nerveuses, contribue à l'apparition de la douleur. En outre, la vasodilatation artériolaire entraîne une augmentation du flux sanguin à l'origine d'une rougeur et d'une chaleur

locales [9]. Comme résultat, apparaissent les signes cardinaux stéréotypés de l'inflammation aiguë, à savoir, la chaleur, l'œdème, la rougeur, la douleur et la perte de fonction.

1.1.1.2 Le recrutement, l'adhésion et la transmigration des leucocytes

À mesure que la réaction vasculo-exsudative se développe, les leucocytes affluent le long de la surface endothéliale. Il s'en suit une traversée active des parois vasculaires en plusieurs étapes. D'abord la marginalisation des leucocytes au voisinage des cellules endothéliales, suivie de leur adhérence grâce aux molécules d'adhésion et enfin leur passage trans-endothélial vers le tissu interstitiel. Cette extravasation des leucocytes est appelée transmigration [10, 11].

L'afflux des cellules se produisant généralement quelques minutes après le début de la réponse inflammatoire aiguë peut, en fonction de l'évolution de la réponse inflammatoire, impliquer des neutrophiles, des lymphocytes, des monocytes, des basophiles ou des éosinophiles. Les premiers répondants sont généralement les neutrophiles ou leucocytes polymorphonucléaires (PMN) qui interviennent dans les 6 à 24 premières heures. Les monocytes et macrophages n'interviennent que plus tardivement, après 24 à 48 heures [11].

La fixation des leucocytes aux cellules endothéliales est médiée par des molécules d'adhésion qui sont complémentaires sur les deux types cellulaires. Deux grandes familles de molécules sont impliquées dans l'adhérence et la migration des leucocytes ; les sélectines et les intégrines [11, 12]. L'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules est régulée par les médiateurs pro-inflammatoires produits localement, notamment les cytokines TNF- α et IL-1 β . D'autres médiateurs, comme les chimiokines, augmentent l'avidité des intégrines pour leurs ligands et orientent la migration des leucocytes [11].

1.1.1.3 La chimiotaxie, l'activation leucocytaire et l'élimination de l'agent pathogène

Une fois dans les tissus extravasculaires, les leucocytes sont attirés par les chimiokines qui guident leur déplacement vers le foyer inflammatoire le long d'un gradient chimique. Ce processus est appelé chimiotaxie. Plusieurs substances exogènes et endogènes possèdent un potentiel chimiotactique, notamment les produits bactériens, les composants du système du complément en particulier le C5a, le PAF, les produits de la voie de la lipoxigénase (LOX) issus

du métabolisme de l'acide l'arachidonique (AA), en particulier le leucotriène B4 (LTB4) ainsi que les cytokines et chimiokines produites par divers types de cellules, notamment l'IL- 8. Ces facteurs chimiotactiques ont une spécificité variable pour les différents types de leucocytes. Par exemple, les peptides C5a induisent une chimiotaxie des neutrophiles et des monocytes, tandis que l'IL-8 n'est chimiotactique que pour les neutrophiles. La protéine chimio-attractrice des monocytes (MCP-1) est chimiotactique pour les monocytes et les lymphocytes T mémoires [13, 14].

Parvenus au foyer inflammatoire, les leucocytes s'activent à la suite de la reconnaissance de l'agent pathogène et deviennent plus granulaires et plus gros. Les monocytes se différencient alors en macrophages et deviennent une source importante d'une large gamme de cytokines, de chimiokines, de médiateurs lipidiques et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [15].

Enfin, l'élimination du pathogène se fait principalement par phagocytose et par destruction intracellulaire. Une phagocytose efficace implique trois étapes distinctes : la reconnaissance et l'attachement aux récepteurs des leucocytes, l'engloutissement puis la fusion des vacuoles phagocytaires avec les lysosomes et les endosomes pour former le phagolysosome, et enfin la dégradation du matériel ingéré dans les phagolysosomes. Cette dernière fait intervenir les ROS, les espèces réactives du nitrogène (NOS) et les enzymes lysosomales. D'autres processus aident à l'élimination du pathogène comme les pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) [16, 17].

1.1.1.4 La résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire

Bien que la réponse inflammatoire se veut avant tout bénéfique, elle peut devenir nocive et causer des dommages collatéraux pour les tissus. En effet, s'ils ne sont pas adéquatement contrôlés, les mécanismes décrits plus haut peuvent amplifier l'inflammation et contribuer à sa chronicité. Il est alors de mise que l'inflammation soit neutralisée une fois l'agent pathogène éliminé.

Dans des conditions idéales, la réaction inflammatoire est auto-limitante et s'estompe aussitôt que l'agent pathogène est éliminé. Ceci peut être expliqué par le fait que l'éradication du pathogène met fin à l'activation des PRR et des médiateurs pro-inflammatoires, réduisant ainsi le recrutement leucocytaire [9]. Mais aussi, parce qu'au fur et à mesure qu'elle s'amplifie,

la réaction inflammatoire déclenche un processus contemporain, à l'origine d'une variété de signaux d'arrêts qui mettent activement fin à la réaction inflammatoire. C'est la résolution de l'inflammation [18, 19].

Regagner l'état initial d'homéostasie nécessite une élimination active et efficace des cellules immunitaires accumulées, notamment les granulocytes et leurs produits toxiques. Ceci fait intervenir un réseau complexe de cellules et médiateurs qui seront discutés en détail au prochain chapitre.

1.1.2 Les médiateurs solubles de l'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation sont les substances qui initient mais aussi régulent les réactions inflammatoires. Ils peuvent se trouver sous forme préformée, stockés dans des granules intracellulaires, desquels ils seront rapidement libérés à la suite des signaux de stimulation (par exemple, l'histamine), ou alors synthétisés *de novo* en réponse à différents stimuli (par exemple, les PG, les LT et les cytokines).

1.1.2.1 Les métabolites de l'acide arachidonique

Les eicosanoïdes, métabolites de l'AA, sont synthétisés par deux grandes classes d'enzymes : les cyclooxygénases (COX), qui génèrent les PG et les LOX, qui produisent les LT et les lipoxines (LX) [20, 21].

Les COX comprennent la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est constitutive et est impliquée dans plusieurs fonctions homéostatiques. À l'opposé, la COX-2 est induite par les stimuli inflammatoires. Souvent coexprimée avec la COX-1 dans les cellules inflammatoires, la COX-2 est généralement impliquée dans la pathogénèse de plusieurs maladies, telles que l'athérosclérose ou encore la RA [22, 23]. D'ailleurs, dans le modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA), la délétion de la COX-2 supprime considérablement l'inflammation synoviale et la destruction articulaire [24, 25].

De leur côté, les PG sont responsables d'une grande partie des signes cardinaux de l'inflammation [26, 27]. La PGE₂, la PG le plus abondamment et le plus largement exprimée, joue un rôle majeur dans la pathogénèse inflammatoire. En effet, dans un modèle murin de neurodégénérescence, la synthèse de PGE₂ induite par les LPS entraîne des effets délétères sur

les neurones et une transmission accrue de la douleur [28]. D'autre part, la PGE2 produite par la synoviale rhumatoïde est impliquée dans la production d'IL-6 et la destruction articulaire [29]. Par ailleurs, dans le modèle d'arthrite induite par les anticorps anti-collagène de type II (CAIA), les souris déficientes du récepteur EP4 de la PGE2 présentent des niveaux significativement bas des cytokines IL-6 et IL-1 β ainsi qu'une franche atténuation des signes cliniques de la maladie [30].

De surcroît, l'importance des COX et des PG dans les réactions inflammatoires est étayée par la large utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), inhibiteurs des COX, comme traitements avérés de plusieurs conditions inflammatoires.

En plus de leur rôle clé comme médiateurs pro-inflammatoires, les PG régulent positivement l'expression de la LOX et la biosynthèse d'autres médiateurs lipidiques qui, au contraire, sont pro-résolutifs. Cette notion sera discutée en détail au prochain chapitre.

Enfin, les LT assurent également diverses fonctions. Par exemples, le LTB4 est un puissant agent chimiotactique et activateur des neutrophiles. Il induit leur agrégation et leur adhésion à l'endothélium veineux ainsi que la génération de ROS et la libération d'enzymes lysosomales. Les LTC4, LTD4 et LTE4, induisent un bronchospasme et une perméabilité accrue des veinules [31]. La figure 1 résume les voies métaboliques de l'AA ainsi que les principales fonctions des eicosanoïdes.

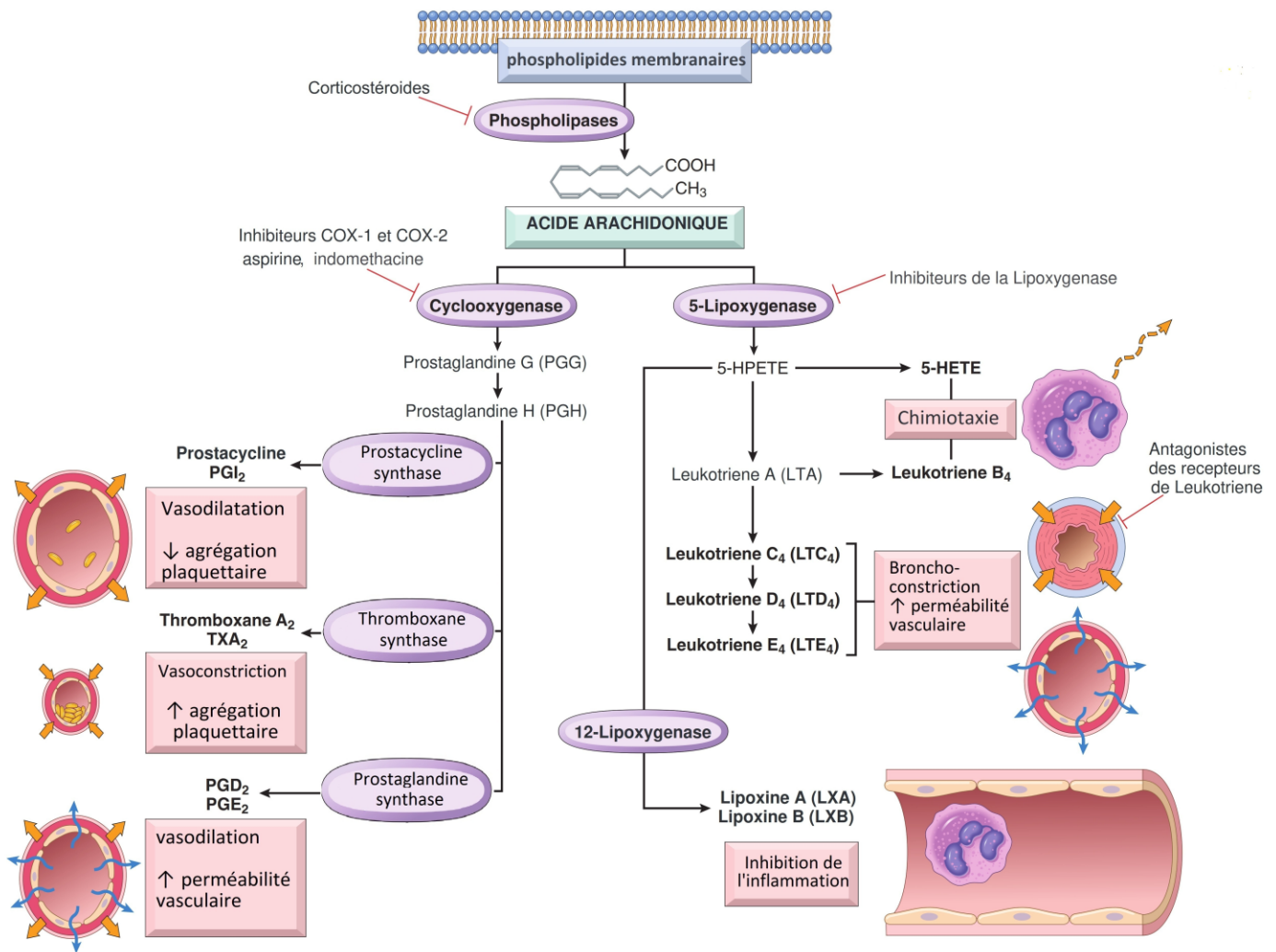


Figure 1. Médiateurs de l'AA et leurs rôles dans l'inflammation.

Les dérivés de l'AA sont produits via l'action des COX et des LOX. Ils accomplissent diverses fonctions physiologiques mais aussi pathologiques. Certains antagonistes des enzymes ou des récepteurs trouvent un intérêt sur le plan clinique, bien qu'ils ne soient pas sélectifs des effets pathologiques. Adaptée de [17]

1.1.2.2 Les cytokines

Modulateurs clés à chaque étape de la réponse inflammatoire, les cytokines affichent une grande diversité d'actions et interagissent avec presque tous les types de cellules.

Parmi les cytokines impliquées dans l'inflammation aiguë, le TNF- α , l'IL-1 et IL-6 jouent un rôle crucial. Ils contribuent non seulement aux réactions locales et systémiques de l'inflammation aiguë mais jouent également un rôle clé dans l'inflammation chronique [32]. À titre d'exemple : l'implication du TNF- α et de l'IL-1 β dans les processus inflammatoires articulaires, notamment dans la pathogénèse de la RA. En effet, des études sur des modèles animaux ont révélé le potentiel arthritique de ces cytokines lorsqu'elles sont injectées directement dans des articulations de lapins et de rongeurs. Ces études ont fourni la première preuve évocatrice que le TNF- α est un médiateur puissant de l'inflammation et que l'IL-1 β est une cytokine cruciale dans les processus érosifs du cartilage et des os. D'autres études démontrent que la surexpression du TNF- α chez des souris est arthrogène [33-35]. Dans ces mêmes modèles, l'IL-1 β joue un rôle crucial dans la propagation de l'inflammation et l'érosion concomitante du cartilage et des os [36]. En outre, la surexpression transgénique d'IL-1 β est à l'origine d'une arthrite érosive [37, 38].

D'autre part, et en synergie avec l'IL-1 β et le TNF- α , l'IL-6 joue un rôle important dans les réactions inflammatoires locales et systémiques. Citons à titre d'exemple ses effets au niveau articulaire, où elle stimule la production de cytokines pro-inflammatoires par les synoviocytes ainsi que la prolifération de ses dernières. De plus, elle favorise l'ostéoclastogénèse et la dégradation articulaire. Enfin, ses niveaux dans le fluide synovial et le plasma des patients atteints de RA, corréleront fortement avec l'activité de la maladie [39, 40].

Par ailleurs, avec l'IL-1 β , l'IL-6 induit la différenciation des lymphocytes Th17, la principale source de l'IL-17. Cette dernière est fortement associée à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques et auto-immunes telles que la RA ou encore le psoriasis. Dans la RA, l'IL-17, en synergie avec le TNF- α , augmente la survie des synoviocytes et contribue au développement de leur phénotype invasif. De plus, elle stimule la production des enzymes impliquées dans la destruction tissulaire [41].

Les effets pathogènes de l'IL-17 observées dans la RA sont également observés dans le psoriasis, où elle joue un rôle crucial dans l'activation des fibroblastes et des kératinocytes, qui à leur tour secrètent les cytokines inflammatoires et les chimiokines, entretenant ainsi la réaction inflammatoire et contribuant à la progression de la maladie [42].

L'identification de ces cytokines comme médiateurs clés dans la pathogénèse inflammatoire, en a fait des cibles thérapeutiques majeures. Ceci est illustré par l'utilisation des inhibiteurs du TNF- α , de l'IL-1 β de l'IL-6 ou de l'IL-17 pour le traitement de diverses maladies inflammatoires telles que la RA ou le psoriasis, et témoigne, par le fait même, de l'importance de ces molécules dans la régulation de l'inflammation [43].

De leur côté, les cytokines anti-inflammatoires jouent un rôle crucial dans la régulation de la réponse inflammatoire, plus précisément, dans la résolution de l'inflammation. Les deux médiateurs les plus évoqués sont le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) et l'IL-10.

Le TGF- β est un puissant suppresseur de l'activation du phénotype pro-inflammatoire des macrophages et un médiateur essentiel de la réparation des tissus [44]. L'IL-10 inhibe également l'activation des macrophages pro-inflammatoires [45]. Ceci est bien illustré dans la maladie de Crohn, où une mutation au niveau de la protéine NOD2 à l'origine d'une production altérée d'IL-10, conduit à une inflammation persistante [46].

1.1.2.3 Les autres médiateurs de l'inflammation

Plusieurs autres agents contribuent à la médiation et à l'entretien de la réponse inflammatoire. Certains contribuent à l'ouverture des jonctions vasculaires telles que l'histamine, les bradykinines et certains constituants du complément comme le C3a et le C5. Les chimiokines agissent en tant qu'agents chimio-attractifs pour les leucocytes les guidant ainsi vers des sites d'infection ou de lésion tissulaire. Le PAF, un médiateur soluble sécrété par les mastocytes activés, est responsable de l'activation et l'agrégation des plaquettes qui, avec les cellules endothéliales, contribue à réduire les fuites de protéines et de liquides plasmatiques vers l'espace extravasculaire [17].

Méiateur	Source	Action
Prostaglandines	Mastocytes, leucocytes	Locale : vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, Systémique : douleur, fièvre
Leucotriènes	Mastocytes, leucocytes	Augmentation de la perméabilité vasculaire, chimiotaxie, adhésion et activation des leucocytes, bronchospasme
Cytokines (TNF, IL-1, IL-6)	Macrophages, cellules dendritiques, fibroblastes, cellules endothéliales et épithéliales, mastocytes	Locale : activation endothéliale (expression des molécules d'adhésion), sécrétion d'autres cytokines Systémique : fièvre, anomalies métaboliques, hypotension
Chimiokines	Leucocytes, macrophages activés	Chimiotaxie, activation des leucocytes
Histamine	Mastocytes, basophiles, plaquettes	Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, activation endothéliale
Facteur d'activation plaquettaire	Leucocytes, mastocytes	Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, adhésion des leucocytes, chimiotaxie, dégranulation, stimulation oxydative, agrégation plaquettaire.
Complément	Plasma (produit par le foie)	Chimiotaxie et activation des leucocytes, (complexe d'attaque membranaire), vasodilatation (stimulation des mastocytes)
Kinines	Plasma (produites par le foie)	Augmentation de la perméabilité vasculaire, contraction du muscle lisse, vasodilatation, douleur

Tableau I. Méiateurs de l'inflammation et leurs actions biologiques.
Adapté de [17].

1.2 Les issues possibles de la réaction inflammatoire aiguë

Les mécanismes cités ci-haut, décrivent le déroulement idéal d'une réponse inflammatoire. Cependant, de nombreuses variables peuvent interférer avec ces processus et influencer son issue, notamment la nature et l'intensité de la lésion initiale, les tissus affectés et la réactivité de l'hôte.

Trois issues peuvent de ce fait faire suite à une réaction inflammatoire aiguë [47, 48]:

- La résolution complète avec la réparation du tissu affecté et la régénération des tissus endommagés.
- La guérison par remplacement du tissu conjonctif (cicatrice ou fibrose), après une destruction substantielle des tissus incapables de régénération.
- La progression vers l'inflammation chronique : comme nous l'avons évoqué précédemment, une réponse inflammatoire non régulée peut conduire à sa pérennisation. La transition vers l'inflammation chronique se produit lorsque l'inflammation aiguë ne peut être résolue.

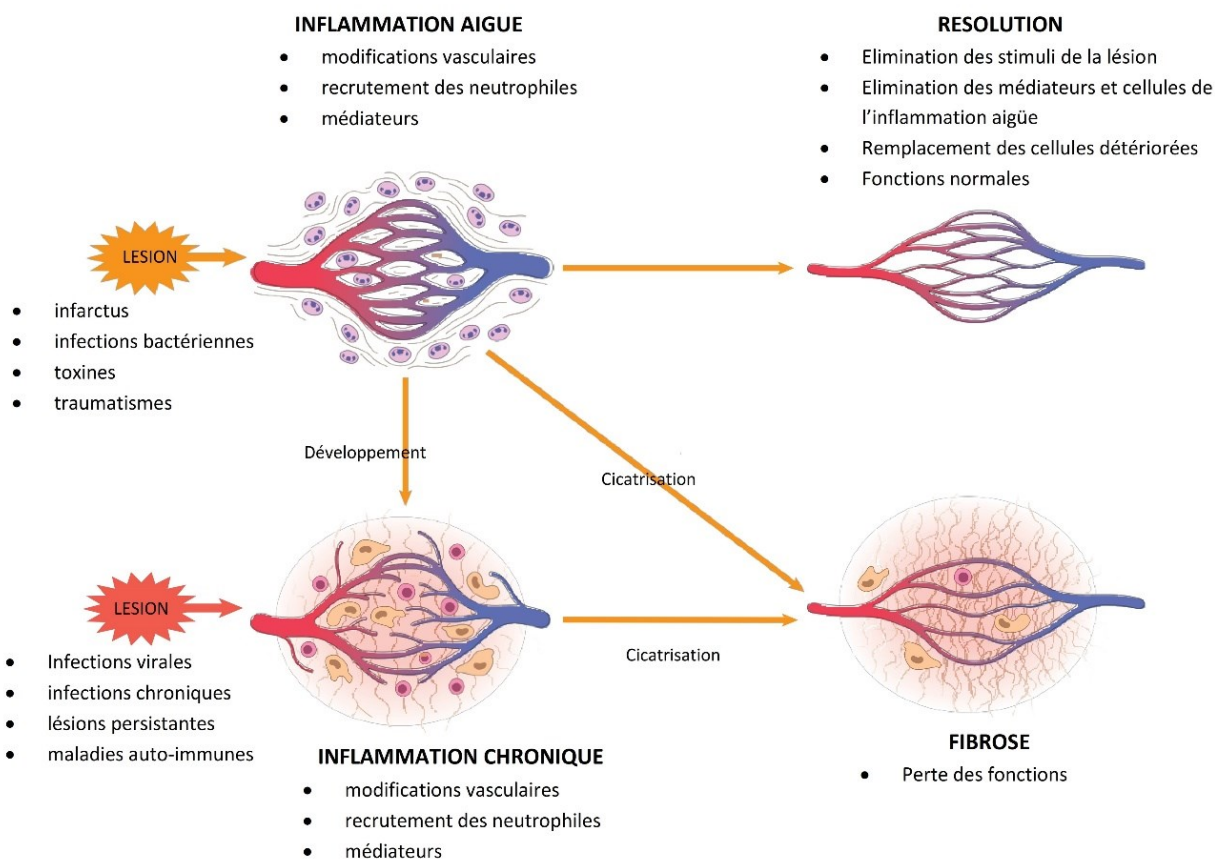


Figure 2. Issues de l'inflammation aiguë.

L'inflammation aiguë aboutit à la résolution, à la fibrose ou alors à l'inflammation chronique. Les caractéristiques de chaque issue sont décrites. Adaptée de [17]

1.3 L'inflammation chronique

L'inflammation chronique est par définition une réponse inflammatoire d'une durée prolongée.

Lors d'un état inflammatoire chronique, l'inflammation aiguë, les dommages tissulaires et les tentatives de réparation coexistent dans différentes proportions.

Tout comme la réponse inflammatoire aiguë, la réponse inflammatoire chronique fait intervenir plusieurs types cellulaires. Cependant, les réponses inflammatoires chroniques sont

parfois marquées par une morphologie relativement spécifique. À titre d'exemple, la formation de granulomes dans la tuberculose, l'infiltration d'éosinophiles dans les infections parasitaires, etc... Dans tous les cas, on assiste à un recrutement de cellules mononucléées de type lymphocytes, des monocytes et des plasmocytes (plutôt que des PMN), une angiogenèse et une augmentation du dépôt de la matrice extracellulaire [49].

L'inflammation chronique peut avoir différentes étiologies. L'incapacité à éliminer l'agent causal est l'une des causes menant vraisemblablement à l'inflammation chronique. C'est le cas des infections bactériennes persistantes comme la tuberculose, où les mycobactéries persistent pour des décennies engendrant un état inflammatoire chronique. Elle peut également être le résultat d'une activation inadéquate du système immunitaire. C'est le cas des maladies d'hypersensibilité comme l'asthme, ou encore des maladies auto-immunes comme la RA [50].

Dans ces maladies, l'inflammation aiguë et chronique coexistent sur de longues périodes et s'entretiennent en une boucle de réactivation continue. La synoviale dans la RA illustre parfaitement bien cet état. Elle présente une infiltration par les macrophages et les lymphocytes, au même temps que le liquide synovial est envahi par une nuée de neutrophiles activés [51].

En outre, il est actuellement reconnu que l'inflammation chronique est une composante majeure de nombreuses maladies non conventionnellement considérées comme inflammatoires. À titre d'exemple, les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, le diabète et l'OA [52].

Enfin, l'inflammation chronique fait le plus souvent suite à une inflammation aiguë qui n'a pu être contrôlée ou résolue. En effet, la non-résolution de l'inflammation est un facteur non négligeable et même si elle n'est pas la cause primaire de ces diverses maladies inflammatoires chroniques, elle peut sous-tendre de manière très significative à leur pathogenèse [49].

2 La résolution de l'inflammation

Comme expliqué précédemment, une réponse inflammatoire bien orchestrée tend à se résoudre par la mise en jeu d'une série d'événements moléculaires et cellulaires bien coordonnés, connue sous le nom de la phase de résolution de l'inflammation. La survenue de cette phase annonce le retour à l'homéostasie et épargne à l'organisme la progression de l'inflammation aiguë vers une inflammation persistante et chronique et empêche l'expansion des dommages tissulaires. Autrement dit, une bonne résolution prévient l'apparition d'une inflammation chronique, composante majeure de la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires.

Ceci n'a pas toujours été aussi bien défini. En effet, pendant la plus grande partie du siècle dernier, les efforts ont été surtout déployés pour la compréhension des mécanismes impliqués dans le déclenchement de la réponse inflammatoire aiguë. L'implication des médiateurs et cellules inflammatoires dans l'initiation de l'inflammation ayant été bien décrite, les recherches se sont vues aboutir à la mise au point d'agents thérapeutiques anti-inflammatoires, capables de limiter l'étendue de la réponse inflammatoire.

Les mécanismes de contrôle et de résolution de l'inflammation étaient cependant beaucoup moins compris. Le point de vue classique était que l'arrêt de la réaction inflammatoire fait suite à la dissipation et la disparition dans le temps des chimiokines, des leucocytes et des autres médiateurs inflammatoires. La résolution de l'inflammation était ainsi considérée comme un processus totalement passif [47].

Depuis, l'incidence croissante des maladies chroniques ainsi que leur lourd fardeau social et économique à travers le monde, ont incité les chercheurs à se pencher de plus près sur l'étude de la réaction inflammatoire. Une meilleure compréhension des mécanismes déclenchant l'inflammation, mais surtout ceux à l'origine de sa résolution, s'est avérée nécessaire. C'est ainsi que des découvertes bouleversantes ont émergé, remettant en question le concept que la dissipation des médiateurs pro-inflammatoires puisse à elle seule expliquer la fin de l'inflammation aiguë. En effet, le travail considérable de ces dernières décennies a abouti à de nouveaux paradigmes définissant les processus inflammatoires et décrivant enfin la phase de

résolution de l'inflammation comme un processus actif. Il nécessite l'activation de programmes endogènes finement coordonnés qui permettent la restauration de l'intégrité et de la fonction des tissus et conduisent au retour de l'homéostasie.

Aujourd'hui, des preuves considérables démontrent qu'un échec ou une altération de la résolution contribuent à la pathogenèse de diverses maladies inflammatoires chroniques [52, 53].

2.1 La cascade de la résolution de l'inflammation

Si l'accumulation de leucocytes dans le tissu atteint est l'aspect histologique caractérisant l'état inflammatoire aigu, l'élimination de ces cellules est la caractéristique principale marquant la résolution de l'inflammation. La résolution prévient les dommages collatéraux causés par l'agent pathogène mais aussi par la réponse inflammatoire, en activant les signes cardinaux de résolution. Ces derniers incluent l'élimination des débris, la clairance de l'agent infectieux, l'analgésie et le regain de fonction [53, 54]. Ils font intervenir certains mécanismes, dont les principaux sont :

- Le catabolisme des médiateurs pro-inflammatoires et la désactivation de leurs voies de signalisation, inhibant ainsi l'infiltration soutenue des neutrophiles, la production des cytokines et la survie des leucocytes ;
- Le recrutement non phlogistique des leucocytes ;
- L'induction de l'apoptose des cellules inflammatoires et leur élimination subséquente par les phagocytes professionnels (efférocytose) ;
- La commutation phénotypique des macrophages : l'efférocytose des neutrophiles déclenche la polarisation des macrophages du phénotype pro-inflammatoire (également appelé phénotype classique) au phénotype de pro-résolution (appelé phénotype alternatif). Les macrophages pro-inflammatoires, principalement activés par l'IFN- γ potentialisent la réaction inflammatoire et interviennent précocement dans l'inflammation. À l'opposé, les macrophages de pro-résolution produisent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et le TGF- β , ainsi que de nombreux autres facteurs de croissance, comme le facteur de croissance analogue à l'insuline-1 (IGF-1) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

(VEGF) contribuant à la réparation, la cicatrisation et / ou au remodelage tissulaire [55]. À vrai dire, le changement de phénotype des macrophages a grandement contribué à promouvoir le concept de résolution de l'inflammation en tant que réponse active ;

- La clairance des cellules apoptotiques vers le système vasculaire ou lymphatique ;
- La stimulation des cellules du système immunitaire adaptatif pour assurer la mémoire ou la tolérance;
- L'initiation des processus de réparation et de régénération des tissus.

Autrement dit, la phase de résolution de l'inflammation est la période s'étendant entre le pic d'afflux des cellules inflammatoires, leur clairance du site inflammatoire et la restauration de l'homéostasie fonctionnelle. Si ces mécanismes sont strictement suivis, l'inflammation aiguë disparaîtra sans causer de dommages excessifs aux tissus et laissera peu de chances au développement d'une inflammation persistante. Si pour une quelconque raison il y a une entrave à l'un ou à plusieurs de ces mécanismes, cela peut contribuer à la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires [53].

Sur le plan moléculaire, la résolution de l'inflammation est un programme hautement régulé, régi par la production spatiale et temporelle de médiateurs pro-résolutifs. Elle est mise en jeu quelques heures après l'initiation de l'inflammation et se chevauche avec celle-ci. En réalité, une réponse inflammatoire appropriée alimente une résolution efficace.

Les étapes séquentielles du processus de résolution de l'inflammation commencent quand l'interaction des cellules de l'immunité innée avec l'agent pathogène déclenche la libération et la formation de PG et LT. En effet, ces eicosanoïdes, notamment la PGE2 et la PGD2, jouent un double rôle crucial. D'une part, ils régulent les événements précoces de la réponse inflammatoire et stimulent le recrutement des leucocytes et PMN. D'une autre part, ils activent la régulation transcriptionnelle d'enzymes responsables de la production d'autres classes d'eicosanoïdes à mesure que la réaction inflammatoire se développe. Ces derniers, également générés à partir de l'AA, favorisent, au contraire, la résolution de l'inflammation. Cet événement est appelé la commutation de classe des eicosanoïdes dérivés de l'AA, passant des PG et LT pro-inflammatoires aux LX anti-inflammatoires, initiant ainsi la séquence de résolution. Ceci est associé à la synthèse d'autres médiateurs lipidiques à partir des acides gras

polyinsaturés oméga-3 (AG ω -3), qui seront abordés en détail dans les prochains paragraphes [18, 48, 56, 57]. La figure 3 illustre le déroulement d'une telle séquence.

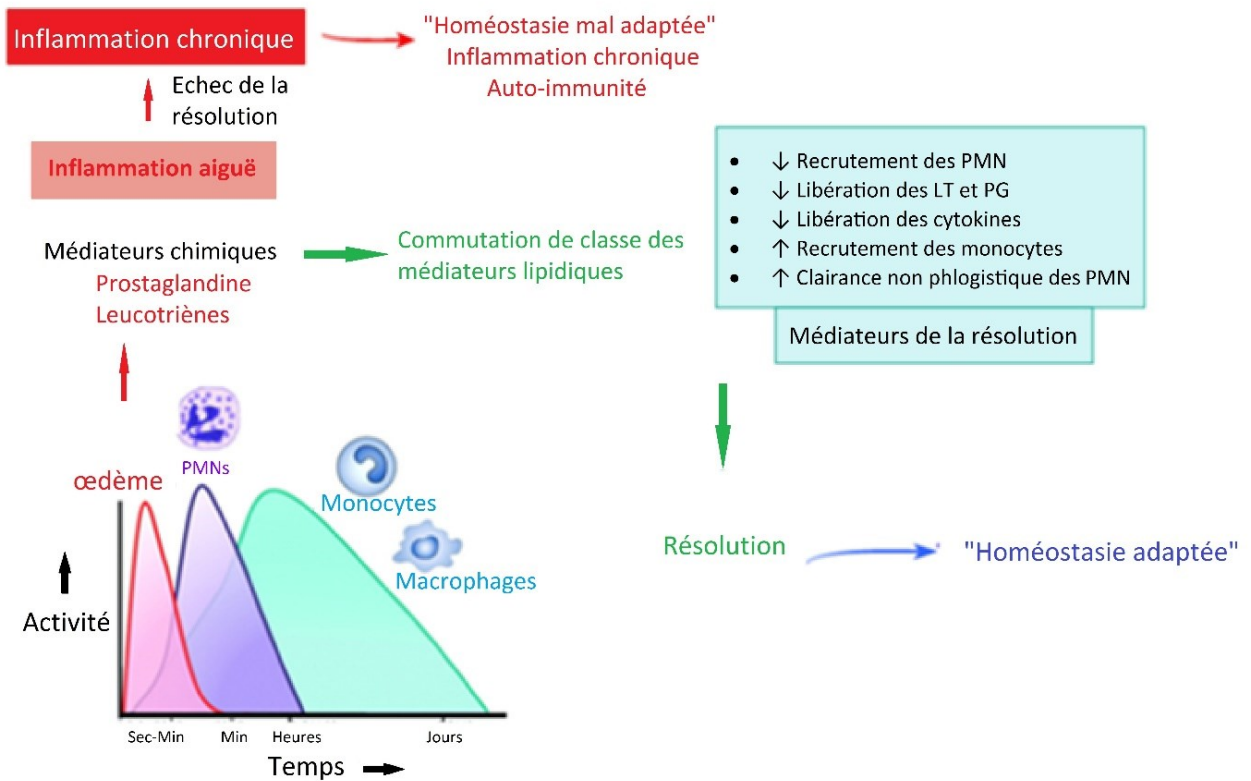


Figure 3. De la réaction inflammatoire aiguë à la résolution de l'inflammation.

L'évolution typique dans le temps de la réponse inflammatoire aiguë, allant de l'initiation à la résolution. L'œdème et l'infiltration des neutrophiles caractérisent l'inflammation aiguë. La commutation de classes de médiateurs lipidiques initie la résolution et mène au recrutement non phlogistique des monocytes / macrophages, entre autres. L'échec de la résolution peut conduire à l'inflammation chronique. Adaptée de [56]

2.2 La post-résolution

Des études récentes suggèrent que la résolution n'est pas la fin des réponses inflammatoires et immunitaires. En effet, il y aurait une troisième phase immunologique lors du processus inflammatoire, qui aboutit à la création d'un microenvironnement propice au développement d'une immunité adaptative. Autrement dit, après une résolution réussie de l'inflammation, les tissus ne reviennent pas à leur état initial en termes de composition cellulaire. Une accumulation de cellules aux propriétés immunologiques particulières a lieu dans les tissus en post-inflammation. Elle modifie leur physiologie immunitaire et influence la sévérité des réponses inflammatoires ultérieures, redéfinissant ce que l'on appelait autrefois l'homéostasie réparatrice comme l'homéostasie adaptée.

Ainsi, la résolution agit comme un pont facilitant l'interaction entre l'immunité innée et adaptative [58, 59].

2.3 Pro-résolutif versus anti-inflammatoire

Il est important de faire la distinction entre les termes anti-inflammatoire et pro-résolutif. Par définition, le premier bloque ou antagonise les principaux médiateurs et voies impliqués dans l'initiation de l'inflammation. À titre d'exemple, les AINS qui inhibent l'action des COX et bloquent par le fait même la synthèse des PG inflammatoires. À l'opposé, un agent de résolution agit comme un activateur ou un agoniste des voies de pro-résolution. Il active les mécanismes de protection et conduit au retour de l'homéostasie [59, 60].

2.4 Les médiateurs de la résolution de l'inflammation

Nous savons maintenant que la résolution de l'inflammation est un processus complexe orchestré par des molécules hautement spécialisées appelées médiateurs de la résolution. De nombreuses molécules de nature aussi diverse que complexe ont été décrites dans ce contexte et de nouvelles autres sont en cours de découverte. Ces médiateurs de résolution peuvent être des lipides, également appelés médiateurs spécialisés de la résolution (SPM) ; des protéines et peptides comme l'annexine A1 (AnxA1), l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), les galectines

et l'IL-10 ; des médiateurs gazeux (H₂S et CO) ; des nucléotides (adénosine et l'inosine) ; ainsi que des neuromodulateurs (acétylcholine et autres neuropeptides).

Dans cette section, nous nous intéresseront plus particulièrement à la classe des médiateurs lipidiques, issus des AG ω -3 [52].

2.4.1 Les acides gras oméga-3

Les AG ω -3, représentés par l'acide eicosapentaénoïque (EPA), et l'acide docosahexaénoïque (DHA), sont particulièrement abondants dans les huiles de poisson et les suppléments nutritionnels apparentés.

Au cours des dernières années, de plus en plus d'études ont rapporté les effets bénéfiques de la supplémentation en AG ω -3 dans plusieurs pathologies. Notons l'exemple de leurs propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires dans l'athérosclérose [61], dans l'asthme [62], ou encore de leurs effets anti-tumoraux et anti-métastatiques dans des cancers [63].

En outre, de nombreuses études rapportent leurs effets positifs chez les patients atteints de RA [64, 65], à l'origine d'une amélioration des symptômes et d'un moindre recours aux AINS [66]. De plus, il est bien établi que la population du Japon, qui consomme de grandes quantités de poisson, présente une faible incidence de RA [67].

Enfin, l'étude multicentrique MOST (*Multicenter Osteoarthritis Study*) [68], évaluant la relation entre les AG ω -3 et 6 avec la synovite et les lésions du cartilage chez les sujets atteints d'OA, a révélé qu'un apport en DHA est associé à une réduction de la dégradation du cartilage.

Toutefois, les mécanismes à l'origine de ces effets positifs ne sont pas encore complètement élucidés. Des explications sur leurs effets bénéfiques à l'échelle moléculaire ont néanmoins été avancées avec la mise en évidence des dérivés lipidiques, les SPM, aux propriétés pro-résolutives remarquables. Par exemple, dans un modèle de douleur inflammatoire induit par l'injection intra-plantaire d'adjuvant complet de Freund, le traitement avec l'EPA ou le DHA a été associé à une réduction de TNF- α secondaire à l'augmentation des taux de résolvine D1 (RvD1), un membre actif des SPM [69]. D'autre part, les souris transgéniques dépourvues, soit de la 12/15-LOX (une enzyme clé impliquée dans la biosynthèse des SPM) ou du récepteur peptide N – formyle 2 (FPR2, un récepteur de haute affinité pour certains SPM), affichent des

lésions articulaires exacerbées dans un modèle d'arthrite inflammatoire par transfert de sérum [70, 71]. Ces études renseignent sur l'implication des SPM dans la médiation des effets bénéfiques des AG ω -3.

2.4.2 Les médiateurs spécialisés de pro-résolution

Ce groupe renferme des médiateurs possédant des actions pro-résolutives et anti-inflammatoires remarquables, spécifiques aux différentes cellules et organes. Ils sont capables de contrôler la durée et l'ampleur de l'inflammation [72].

Les SPM sont regroupés en quatre familles ; les LX, les résolvines, les protectines (PD) et les marésines (MaR). [56].

La première famille de médiateurs aux propriétés anti-inflammatoires et pro-résolutives ayant été identifiée est celle des LX, avec les LXA4 et LXB4 comme seuls membres [57].

Les résolvines, dont l'appellation dérive de « *resolution phase interaction products* », comprennent deux séries ; les résolvines de la série E (RvE) et les résolvines de la série D (RvD). La série des RvE englobe quatre médiateurs bioactifs, dont le plus important est la RvE1. Celle des RvD en regroupe six ; de la RvD1 à la RvD6 [56]. La RvD1 ne sera pas abordée dans cette section. Elle sera traitée en détail au prochain chapitre.

Les termes protectine et neuroprotectine sont inspirés de l'effet protecteur et anti-inflammatoire de ces médiateurs dans les tissus neuronaux. Lorsqu'elle est produite dans des systèmes neuronaux, la PD1 est appelée neuroprotectine D1 (NPD1) [56].

La famille des MaR comprend deux membres ; la MaR1 et la MaR2, dont l'appellation est issue de l'abréviation de « médiateurs produits par les macrophages » [73].

Enfin, il existe une famille particulière de SPM qui sont dérivés de l'acide docosapentaénoïque (n-3 DPA). Chez les mammifères, l'EPA est converti par allongement et désaturation en DHA en passant par un intermédiaire, le n-3 DPA [74]. Chez l'homme, l'augmentation des taux de n-3 DPA en circulation ne semblent pas être directement associée à l'apport alimentaire mais à un polymorphisme dans les gènes codant pour l'élongase des acides gras (ELOVL2) et la protéine régulatrice de la glucokinase (GCKR), responsables de la conversion de l'EPA en DHA [75]. Cette augmentation des niveaux de n-3 DPA est également

associée à une réduction des niveaux de DHA en circulation. Le n-3 DPA est alors converti en de nouveaux médiateurs, congénères des RvD, PD et MaR, ayant des actions comparables à celles-ci. Ces médiateurs sont appelés RvDn-3 DPA, PDn-3 DPA, MaRn-3 DPA. Ils agissent comme des mécanismes compensatoires pour les SPM lors des déficits en DHA [74].

La figure 4 illustre les voies de biosynthèse ainsi que les structures chimiques des différents SPM.

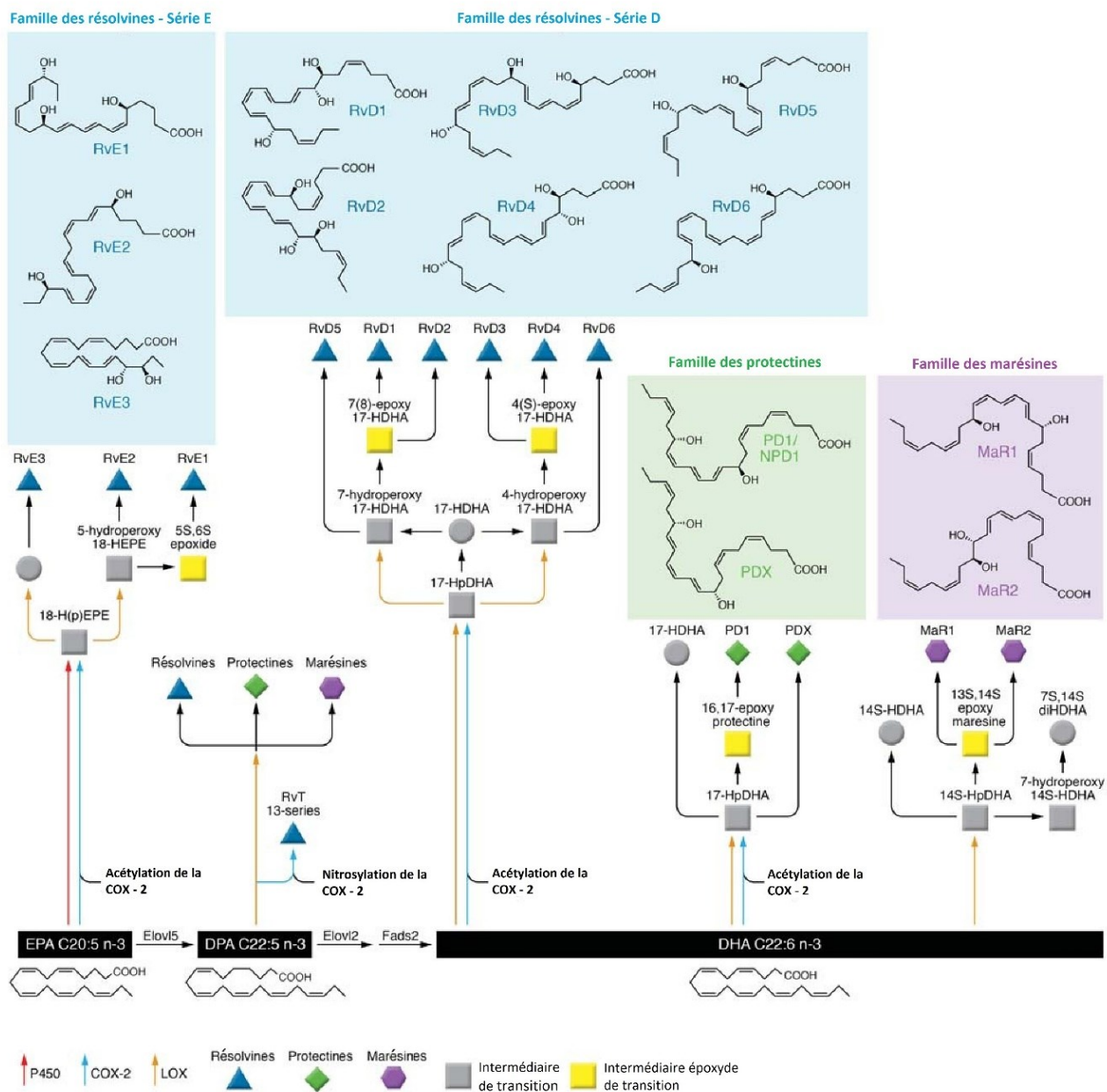


Figure 4. Voies de synthèse des SPM à partir de leurs précurseurs.

Illustration du réseau des précurseurs, enzymes et intermédiaires et de la biosynthèse des SPM. Les RvE sont issues de l'EPA via l'action du CYP450 ou de la COX-2 acétylée. Les RvD, PD et MaR sont issues du DHA ou du n-3 DPA, via la voie de la LOX ou de la COX-2 acétylée. La stéréochimie de chaque SPM est présentée. Adaptée de [56]

2.4.2.1 Les effets biologiques des SPM

Les SPM exercent de puissantes actions dans divers types de cellules *in vitro*, ainsi que dans de nombreux modèles de maladies inflammatoires *in vivo*. Certaines sont communes à tous les SPM, telles que la capacité de réguler l'infiltration des leucocytes et le recrutement non phlogistique de monocytes, l'activation de l'efférocytose des cellules apoptotiques, la clairance des phagocytes du site enflammé et la potentialisation des fonctions cellulaires antimicrobiennes [53]. D'autres actions sont propres et caractéristiques de chaque SPM. Quelques exemples non exhaustifs sont brièvement présentés au tableau II.

Médiateur	Précurseur	Récepteur	Effets biologiques
RvE1	EPA	ERV1 (Chem 23) / BLT1	<ul style="list-style-type: none"> - Parodontite chez le rat : protection contre la destruction osseuse par les ostéoclastes [76] - Péritonite chez la souris : bloque le recrutement des PMN, régule la production des chimiokines et cytokines, favorise l'élimination lymphatique des phagocytes [77, 78] - Rétinopathie chez la souris : protège contre la néovascularisation [79] - Colite chez la souris : réduit le recrutement des PMN et l'expression du gène pro-inflammatoire, améliore la survie, réduit la perte de poids [80] - Infection bactérienne (<i>P. gingivalis</i>) chez le rat : réduit la formation d'œdèmes et l'infiltration des PMN [81] - Insulinorésistance chez la souris : protège contre la stéatose hépatique, réduit l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux, augmente l'adiponectine, GLUT-4 et PPAR-γ [82] - Asthme chez la souris : réduit l'infiltration des leucocytes dans les voies respiratoires, réduit la sécrétion des cytokines, augmente IFN-γ et LXA4, améliore les fonctions pulmonaires [83]

RvE2	EPA	ERV (Chem23) / BLT1	Associée à des scores de douleur plus faibles chez les patients atteints de RA [84]
RvD2	DHA	DRV2 (GPR18)	Ischémie cérébrale par reperfusion : améliore la récupération de la perfusion et favorise l'artériogénèse [85]
RvD3	DHA	ALX /FPR2 DRV1 (GPR32)	Protection des tissus pulmonaires chez la souris [86]
LXA4	AA	ALX/FPR 2	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de l'obstruction respiratoire causée par la LTC4 chez les patients asthmatiques [87] - Modulation allostérique endogène du récepteur CB1 des cannabinoïdes à l'origine de la réduction de la douleur [88]
PD1/NPD1	DHA		<ul style="list-style-type: none"> - Asthme chez la souris : protège contre l'inflammation et l'hyperréactivité des voies respiratoires [89] - Réduit la gravité et l'incidence de la kératite causée par le virus de l'herpès simplex [90] - Modèle murin d'obésité : augmentation de PPAR-γ et de l'adiponectine, sensibilisation à l'insuline [82] - Rétinopathie chez la souris : protège contre la néovascularisation [79]
MaR	DHA		<ul style="list-style-type: none"> - Effet anti-nociceptif par la régulation du TRPV1 [91] - Protection des hépatocytes par la régulation de l'expression des miARN et l'amélioration la capacité phagocytaire des cellules de Kupffer [92]

Tableau II. Médiateurs lipidiques de la résolution de l'inflammation et leurs actions biologiques.

Il est aujourd'hui évident que promouvoir la résolution de l'inflammation pourrait contribuer à mettre fin aux états inflammatoires caractérisant plusieurs maladies. La disponibilité de plusieurs des médiateurs de résolution au niveau commercial a accéléré les enquêtes sur leurs actions biologiques à travers le monde. Ils peuvent être utilisés tant comme agents thérapeutiques que comme biomarqueurs, voire même comme un outil d'évaluation de l'efficacité de certains traitements spécifiques.

Les prochaines lignes se penchent de plus près sur un SPM en particulier ; la RvD1. Elles dressent un profil détaillé de ce remarquable médiateur, décrivant sa synthèse, ses récepteurs ainsi que ses effets biologiques jusque-là observés.

Notre choix d'étudier la RvD1 a été dicté par son potentiel biologique remarquable mais aussi par le fait qu'elle soit détectée dans les articulations de la souris et de l'homme, laissant croire à une nouvelle avenue thérapeutique pour les maladies articulaires.

3 La résolvine D1

La première fois que la notion de résolvines a été introduite, était au « *11th International Conference on Advances in Prostaglandin and Leukotriene Research* », en Italie, en l'an 2000, par le groupe de recherche de Dr. Charles Serhan.

Les résolvines ont été identifiées pour la première fois en utilisant un modèle inflammatoire murin, où de l'air stérile a été injecté pour créer des poches sous-cutanées, dans lesquelles le TNF- α , les AG ω -3 et l'aspirine ont été injectés. Des analyses lipidomiques des exsudats de la phase de résolution ont alors mis en évidence l'existence d'une série de molécules, jusque-là inconnues, dérivées des AG ω -3 et qui sont activement impliquées dans la phase de résolution de l'inflammation. Ce sont les SPM.

Parmi les SPM, la RvD1 a suscité un intérêt considérable au cours de la dernière décennie en raison des données croissantes montrant son potentiel à réguler une panoplie de mécanismes impliqués dans l'inflammation, le stress oxydatif et la mort cellulaire, mais aussi dans la régénération tissulaire [93]. Très largement distribuée dans l'organisme, sa production a été observée dans divers types de cellules et tissus, notamment les glandes salivaires, la rétine, les cellules épithéliales et endothéliales, les leucocytes et les neutrophiles, entre autres [94, 95].

3.1 La biosynthèse de la RvD1

La biosynthèse de la RvD1 à partir de son précurseur, implique deux voies distinctes faisant ou non intervenir l'aspirine, pour donner les isomères R et S, respectivement. Les épimères R sont plus stables sur le plan métabolique.

Ayant comme point de départ de DHA, la biosynthèse de la RvD1 implique deux étapes de lipoxygénation successives, par l'action de la 15-LOX chez l'homme (mais 12/15-LOX chez la souris), suivie de celle de la 5-LOX pour générer plusieurs intermédiaires époxydes distincts. En effet, le DHA est en premier lieu converti en 17S-hydroperoxyDHA (17SHpDHA), lui-même converti en 17S-hydroxy-DHA (17S-HDHA). La seconde lipoxygénation par la 5-LOX en position C-7 aboutit à un intermédiaire peroxyde le 7-hydroperoxy-17S-HDHA qui sera converti en époxyde 7S, 8S-époxy 17S-H-DHA puis hydrolysé pour générer un produit

trihydroxylé, à savoir la RvD1. Ces conversions enzymatiques peuvent se produire dans un seul type de cellules quand il exprime les deux enzymes ou alors de manière transcellulaire. Par exemple, les éosinophiles humains riches en 15-LOX produisant le 17HpDHA, qui sera converti par 5-LOX des PMN en RvD1 [96].

3.1.1 La biosynthèse de la résolvine D1 induite par l'aspirine

La biosynthèse des résolvines peut être renforcée par l'un des médicaments anti-inflammatoires les plus largement utilisés, à savoir l'aspirine. En effet, la COX-2 acétylée par l'aspirine, agit comme une dioxygénase modifiée, insérant une molécule d'oxygène de stéréochimie opposée. Lors de la biosynthèse de la RvD1, elle transforme le DHA en catalysant la commutation de l'oxygène de la position C-13 à la position C-17 avec une configuration R au lieu de la configuration S décrite plus haut, générant ainsi le 17R-HpDHA. Les transformations enzymatiques ultérieures similaires à celles décrites plus haut, conduisent à des isomères 17R de la RvD1, appelés isomères induits par l'aspirine (AT-RvD1) [96], tel qu'illustré dans la figure 5.

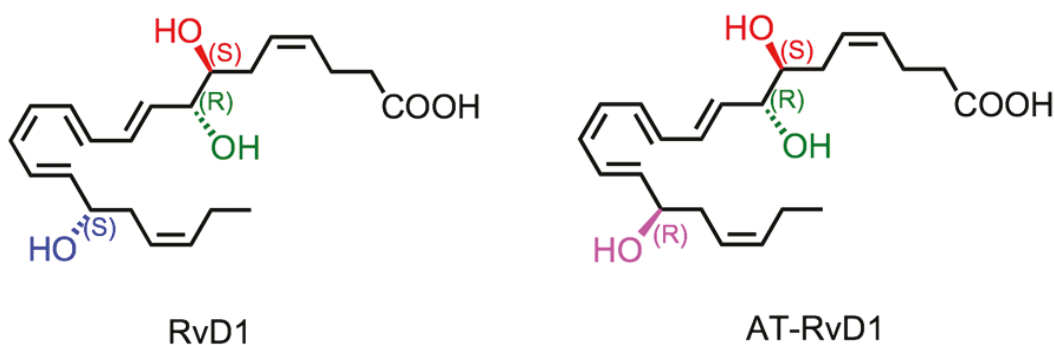


Figure 5. Épimères S et R de la RvD1.

L'AT-RvD1 présente une configuration R au C17 au lieu de la configuration S de la RvD1. Adaptée de [60]

3.2 Les récepteurs de la RvD1

Tout comme pour les médiateurs pro-inflammatoires, les actions biologiques des SPM en général et de la RvD1 en particulier sont stéréosélectives, médiées par l'activation de récepteurs spécifiques.

À ce jour, deux récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) ont été identifiés pour la RvD1 ; le récepteur de la LXA4 ; ALX / FPR2 et le récepteur GPR32 ou DRV1 (figure 6). La RvD1 interagit autant avec le ALX / FPR2 qu'avec le DRV1, dépendamment de l'environnement dans lequel elle se trouve. De façon générale, elle active le DRV1 pour les fonctions homéostatiques, tandis qu'elle interagit avec le ALX / FPR2 pour s'opposer aux actions des neutrophiles dans les conditions inflammatoires [97].

3.2.1 ALX / FPR2

Le récepteur de la LXA4 qui fait partie de la superfamille des récepteurs formyle peptide, est le premier récepteur des voies de résolution ayant été identifié. Il est présent sur plusieurs types de cellules, notamment les leucocytes, les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes et les macrophages [97]. Il lie spécifiquement la LXA4, la RvD1, la RvD3 et leurs épimères ainsi que l'AnxA1 [98].

L'activation des voies de signalisation en aval du récepteur dépend du ligand ainsi que du type cellulaire. Par exemple, son activation par la LXA4 augmente le niveau de calcium intracellulaire dans les cellules conjonctivales mais pas dans les neutrophiles humains. D'autre part, la liaison de la protéine pro-inflammatoire, l'amyloïde A sérique (SAA), qui entre en compétition avec les SPM, active une cascade d'inflammation. En effet, l'activation du récepteur ALX / FPR2 par les SPM entraîne son homo- ou hétéro-dimérisation avec les récepteurs FPR1 et FPR3 (les deux autres membres de sa famille), à l'origine d'une cascade de signalisation en aval, résultant entre autres en la régulation à la hausse de l'IL-10. À l'opposé, son activation par la SAA entraîne la production de médiateurs pro-inflammatoires [99].

3.2.2 GPR32 ou DRV1

Le récepteur GRP32 ou DRV1 est exprimé chez les leucocytes, sur le tissu artériel et veineux, chez les cellules myéloïdes et chez les macrophages. Il lie la RvD1, la RvD3, la RvD5 et la LXA4 [100].

Son activation conduit à l'inhibition du chimiotactisme des macrophages induit par la chimérine et la CCL2 (*chemokine ligand 2*). De plus, il régule la production des cytokines pro-inflammatoires ; l'IL-1 β et l'IL-8. Chez les macrophages, son activation par la RvD1, a été associée à l'amélioration de l'efférocytose ainsi qu'à la suppression de l'expression de la p50, un facteur important dans la signalisation de TNF- α [101].

L'implication de ces deux récepteurs dans les actions de la RvD1 a été mise en évidence dans des cellules surexprimant le ALX / FPR2 et le GPR32 et traitées par le TNF- α et la RvD1. Ces cellules ont montré une baisse de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, ainsi qu'une amélioration de l'efferocytose. L'inactivation de ces récepteurs, au contraire, atténue ces actions [102].

Par ailleurs, chez des souris transgéniques surexprimant le ALX/ FPR2, le traitement par la RvD1 a montré une réduction de 50% du recrutement des PMN, comparé aux souris témoins [102]. De plus, des études métabololipidomiques des exsudats inflammatoires ont révélé que la RvD1 induit une réduction significative des médiateurs pro-inflammatoires, notamment les PG et la LTB₄, chez les souris témoins, qui est complètement absente chez les souris déficientes en ALX / FPR2.

Que ce soit via le ALX / FPR2 ou via le GPR32, les voies de signalisation de la RvD1 ne sont pas encore clairement identifiées. Certaines études rapportent l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et ERK 1/2, par la RvD1, dans un modèle inflammatoire de fibroblastes pulmonaires. Dans ce modèle, la RvD1 inhibe l'expression de la COX-2 ainsi que la production des PG et des LT [103]. Les voies de transduction des signaux de la RvD1 via ses récepteurs ALX/FPR2 et GPR32 passe également par les microARN (miR) notamment les miR-146b, miR-208a et miR-219, largement impliqués dans les réponses inflammatoires [104, 105]. En effet, l'activation de miR146b est associée à une répression de l'activité de NF- κ B. Celle de miR-219

est associée à l'inhibition de la 5-LOX et de la production de LT, tandis que le miR208a est associé à la régulation de l'IL-10 [104].

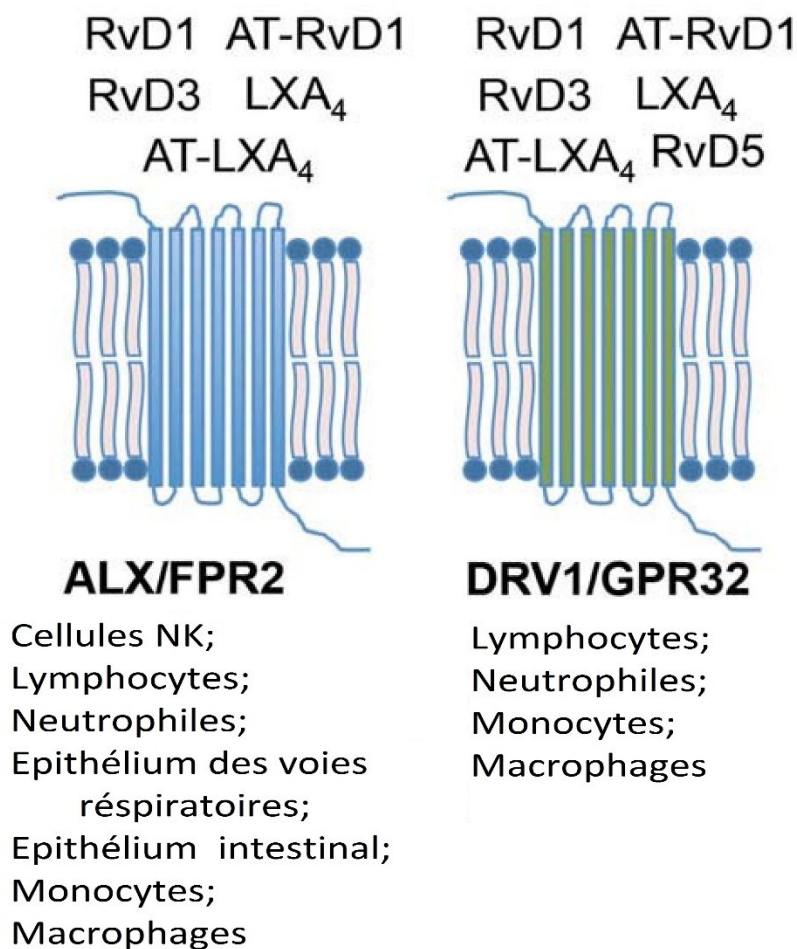


Figure 6. Récepteurs de la RvD1.

Les interactions entre la RvD1 ainsi que d'autres SPM avec leurs GPCR respectifs, sur les différentes cellules cibles. Le ALX / FPR2 lie la RvD1, la LXA4 et leurs épimères, ainsi que la RvD3. Le DRV1 lie la RvD1, la LXA4 et leurs épimères, ainsi que la RvD3, la RvD5. Adaptée de [106]

3.3 Les effets biologiques de la RvD1

La RvD1 est la mieux étudiée des RvD à ce jour. À l'instar des autres SPM, elle possède la capacité d'inhiber l'infiltration de PMN et d'atténuer leur activation, d'accroître la phagocytose des macrophages ainsi que la clairance des cellules apoptotiques et bactériennes, en plus de favoriser le phénotype de pro-résolution des macrophages. [97].

En outre, elle exerce des effets directs sur la réponse immunitaire adaptative, en agissant sur les cellules B pour réduire la production d'immunoglobulines E [107], ou alors sur les cellules T pour réguler diverses réponses, telles que la production de TNF- α [108]. Plus important encore, la RvD1 régule la biosynthèse des LT pro-inflammatoires et stimule la synthèse des LOX ainsi que des autres SPM [109].

Ces actions ont été mises en évidence *in vitro*, mais aussi dans des modèles *in vivo* portant sur plusieurs systèmes de l'organisme, où la RvD1 a été active à des concentrations de l'ordre du nano-molaire.

Quelques exemples non-exhaustifs d'études précliniques étayent le potentiel thérapeutique de la RvD1. En effet, il a été démontré que la RvD1 réduit l'inflammation oculaire [110-112], protège contre l'infarctus du myocarde [113] et atténue la douleur [114, 115]. Elle a également montré une protection rénale [116] et une amélioration de la cicatrisation des plaies [117]. De plus, elle réduit la croissance tumorale et potentialise le traitement anticancéreux [118].

Sur le système respiratoire, la RvD1 réduit l'inflammation des voies respiratoires [119-122], ainsi que les réponses pulmonaires allergiques [123]. Dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*, la RvD1, à 100 ng par souris, atténue l'infiltration des leucocytes ainsi que les lésions pulmonaires. Par ailleurs, des études rapportent que les niveaux de la RvD1 et de la 17R-RvD1 sont plus élevés dans le plasma des patients tuberculeux par rapport aux patients non tuberculeux, probablement en tant qu'une réponse de défense de l'hôte [124].

Dans le système vasculaire, Fredman et al. [125] rapportent qu'un déséquilibre marqué entre la RvD1 et les LT pro-inflammatoires en faveur de ces dernières, est associé à une inflammation vasculaire chez l'homme. Ces données ont été étayées par la mise en évidence de

l'efficacité pharmacologique de la RvD1 chez des souris atteintes d'athérosclérose [125]. En outre, dans un modèle d'endométriose, la RvD1 diminue la perméabilité vasculaire et diminue la sévérité de l'hyperplasie vaginale [126].

D'autres études ont dévoilé l'effet analgésique de la RvD1 dans le traitement de la douleur inflammatoire en agissant en tant que puissants inhibiteurs endogènes des récepteurs TRPV1 (*transient receptor potentiel vanilloid type 1*) et TRPA1 (*transient receptor potentiel ankyrin type 1*) [127, 128].

Enfin, dans un modèle murin d'obésité, Hellmann et al. [129] décrivent le rôle important de la RvD1 dans la régulation de l'inflammation dans les tissus adipeux par l'augmentation de la production d'adiponectine et la diminution de l'IL-6.

Toutes ces propriétés et bien d'autres encore, témoignent du potentiel thérapeutique de la RvD1 pour traiter un bon nombre de pathologies inflammatoires et infectieuses. Cependant, il existe encore un manque important de données traitant de ses effets dans les maladies ostéoarticulaires. De plus, le rôle de la RvD1 dans le métabolisme osseux est encore très peu documenté.

Le prochain chapitre portera essentiellement sur la physiopathologie ostéoarticulaire. Il comportera une brève description de la structure et de la physiologie articulaire, avant d'aborder deux principales pathologies touchant l'articulation, à savoir l'OA et la RA.

4 L'inflammation, la résolution de l'inflammation et l'articulation

4.1 Structure d'une articulation saine

L'articulation est la jonction entre deux os, elle a pour fonction de relier les os entre eux assurant la mobilité du squelette.

Les diarthroses, par opposition aux amphiarthroses et synarthroses (articulations peu ou pas mobiles) sont les articulations le plus fréquemment retrouvées dans l'organisme (genou, coude, hanche etc. ...) et sont typiquement constituées de tissu osseux, de tissu cartilagineux, d'une membrane synoviale tapissant les cavités articulaires, de liquide synovial et de tissus élastiques tels que les ligaments et les tendons. Nous nous attarderons à décrire successivement les trois principales composantes, à savoir, le cartilage, l'os sous-chondral et la membrane synoviale (figure 7) [130].

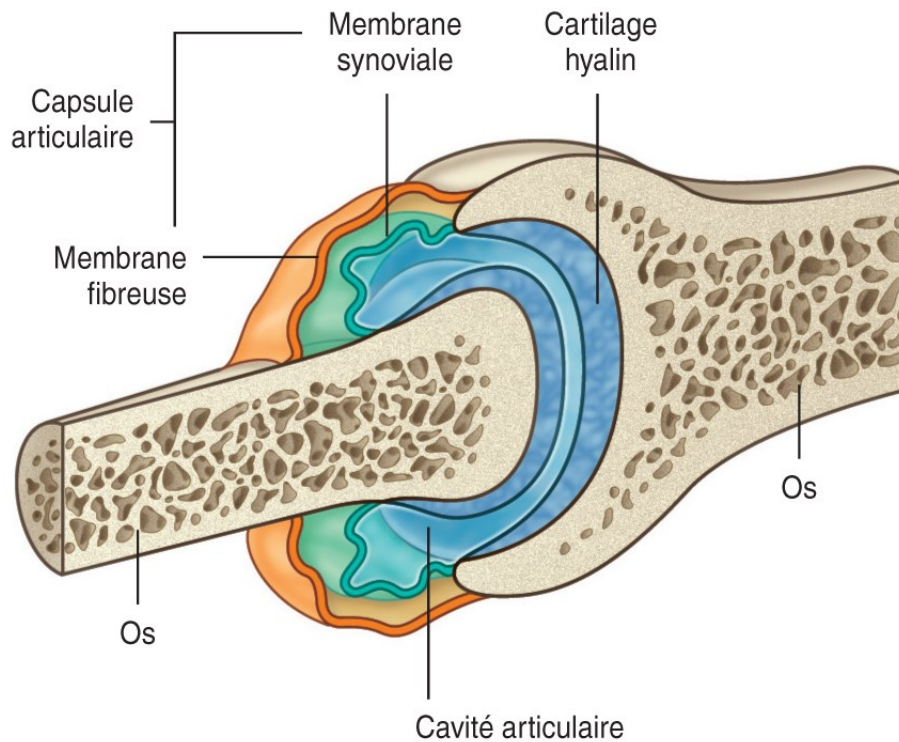


Figure 7. Structure d'une articulation saine.

Le cartilage hyalin recouvre les extrémités osseuses et possède un rôle protecteur sur celles-ci. La capsule articulaire est constituée de la membrane synoviale interne et de la membrane fibreuse externe. La membrane synoviale est attachée sur les berges des surfaces articulaires, à la limite entre le cartilage et l'os. Elle limite la cavité articulaire et sécrète le liquide synovial dans la cavité articulaire dont le rôle essentiel est de lubrifier les surfaces articulaires. Adaptée de [130].

4.1.1 Le cartilage articulaire

Du fait de son importance fonctionnelle et des pathologies l'affectant, le cartilage articulaire est le tissu cartilagineux le mieux connu et le plus étudié. C'est un tissu hautement spécialisé, aux propriétés mécaniques intéressantes. Interposé entre deux surfaces osseuses, il assure leur glissement l'une sur l'autre lors des mouvements, avec un minimum de friction. Sa structure lubrifiée, à la fois élastique et résistante, lui confère un rôle d'amortisseur. Elle lui permet d'absorber les pressions et les chocs auxquels il est soumis [130, 131].

D'un point de vue histologique, le cartilage est un tissu conjonctif ayant un aspect translucide (hyalin), non vascularisé, dépourvu de circulation sanguine ou lymphatique et non innervé. Ses apports en énergie sont par conséquent dépendants du liquide synovial et de l'os sous-chondral [132].

Le tissu cartilagineux est formé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, éparses dans une matrice extracellulaire (MEC) abondante et complexe. Elle est essentiellement composée d'eau, de protéoglycanes et de collagène en plus des macromolécules et des protéines. Les constituants du cartilage s'organisent en une structure unique, hautement différenciée suivant un ordre bien défini. C'est ainsi que quatre zones sont différenciées depuis la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral en fonction de leur composition, activité métabolique et propriétés biomécaniques. La figure 8 montre la séparation entre la couche superficielle, la couche intermédiaire ou transitionnelle, la couche profonde et la couche calcifiée [133].

La jonction entre les zones calcifiée et non calcifiée étant clairement marquée, elle correspond au front de minéralisation. Cette jonction très irrégulière et particulièrement résistante, est perforée par de rares vaisseaux venant des cavités de la moelle osseuse sous-jacente [133].

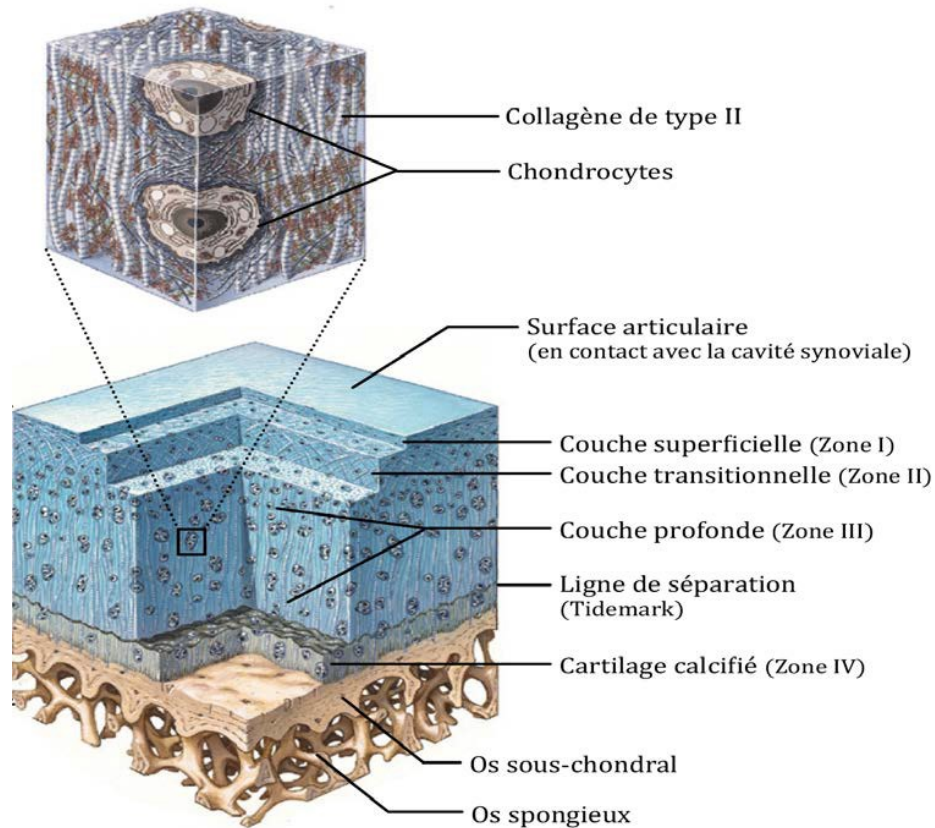


Figure 8. Différentes couches du cartilage et de l'os articulaires.

Les différentes zones composant le cartilage se séparent en : couche acellulaire qui recouvre la couche superficielle (zone I); couche intermédiaire ou moyenne (zone II) composée de cellules rondes et plus grandes; couche profonde (zone III). La ligne de démarcation la « *tidemark* » correspond au front de calcification et délimite le cartilage calcifié. Enfin, le tissu osseux comprends l'os sous-chondral et l'os cortical [133].

4.1.1.1 Les chondrocytes

Unique type cellulaire du cartilage, les chondrocytes ne représentent qu'environ 1 à 5 % du volume du cartilage adulte total. Ce sont des cellules mésenchymateuses, très différenciées et hautement spécialisées [131, 134].

À l'état normal, les chondrocytes sont des cellules quiescentes qui ne se divisent que très peu et qui sont dépourvues de capacités de migration. En raison du caractère avasculaire du cartilage, ils privilégient la voie de la glycolyse anaérobie pour leur métabolisme, l'apport des nutriments se faisant principalement par l'os sous-chondral ou le liquide synovial [135].

La principale fonction des chondrocytes est de synthétiser les constituants de la matrice extracellulaire afin de maintenir l'homéostasie de la MEC. Ils assurent un équilibre entre sa synthèse et sa dégradation, essentiel au cartilage. De plus, ils produisent et organisent très minutieusement la structure du cartilage en fibres de collagènes, protéoglycanes et molécules non collagéniques [135].

4.1.1.2 La matrice extracellulaire

Composée principalement d'eau, de fibres de collagène et de protéoglycanes. L'eau, la composante la plus abondante (60-80 %) se répartit dans les espaces entre les protéoglycanes et le collagène et joue un rôle de transport de solutés et de lubrification articulaire. L'interaction entre le collagène et le réseau de protéoglycanes assure la rigidité et la cohésion de la MEC [131, 133].

4.1.1.3 Le collagène

Le collagène, dont 90 à 95 % est de type II, représente 40% à 70% du poids sec du cartilage. Il s'agit d'un homotrimère formé de trois chaînes $\alpha 1$ identiques enchevêtrées entre elles et organisées en un réseau dense et dont la disposition varie de la superficie à la profondeur. Le collagène est ainsi responsable de la rigidité du cartilage et joue un rôle fondamental dans le maintien de la structure de la MEC. Les autres types de collagène sont dits "mineurs", parmi lesquels : le collagène de type I, IV, V, IX, X dont les fonctions sont très variées [131, 133].

4.1.1.4 Les protéoglycanes

Au sein de ce réseau de collagène, des macroagrégats de protéoglycanes hydrophiles sont emprisonnés. Ils constituent environ 30 à 35% du poids humide du cartilage. Ils sont formés par une protéine porteuse sur laquelle viennent se fixer des molécules de glycosaminoglycanes. Ces monomères appelés agrécans se regroupent en macro agrégats en se liant sur un autre glycosaminoglycane, l'acide hyaluronique, pour former des polymères de protéoglycanes. En

raison de leur pouvoir hydrophile, les protéoglycanes retiennent les molécules d'eau et mettent sous tension les fibres de collagène permettant la résistance aux pressions cycliques auxquelles le cartilage est soumis [131].

La figure 9 illustre l'organisation du cartilage articulaire.

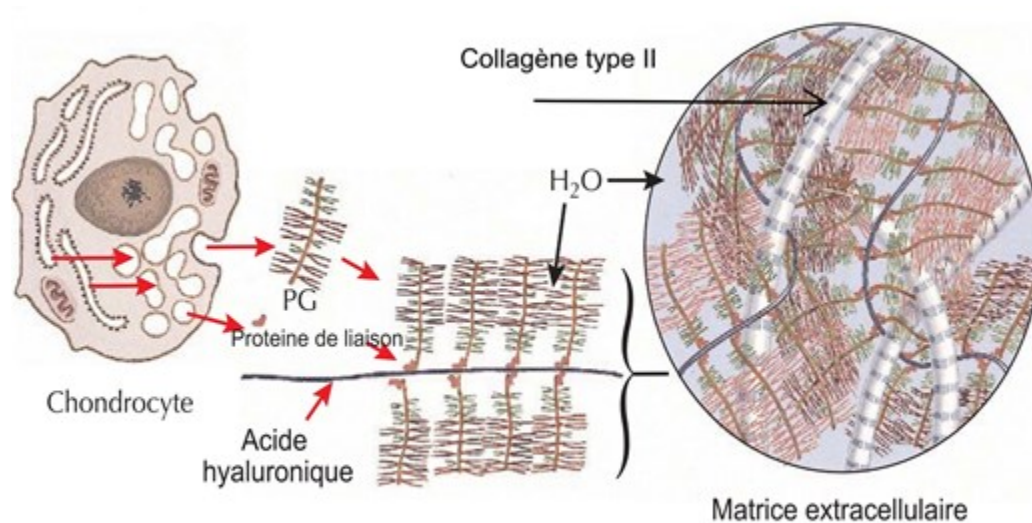


Figure 9. Organisation de la matrice extracellulaire du cartilage.

Le chondrocyte synthétise et sécrète le collagène de type II et les protéoglycanes qui interagissent pour former la MEC du cartilage. Le collagène de type II est disposé dans la couche moyenne du cartilage emprisonnant les protéoglycanes, eux-mêmes attachés sur une longue molécule d'acide hyaluronique [133].

4.1.2 L'os sous-chondral

Juste en dessous du cartilage articulaire se trouve une lame osseuse sous-chondrale. Elle constitue une zone de transition entre le tissu cartilagineux et l'os trabéculaire et joue ainsi un rôle primordial dans l'amortissement des chocs en minimisant le stress mécanique du tissu

cartilagineux. Il permet au même titre que le cartilage calcifié de transformer les forces de cisaillement en des forces de pression [131].

Contrairement au tissu cartilagineux, l'os sous chondral est innervé et vascularisé et très perméable, permettant le transport des nutriments de la moelle osseuse au cartilage, ayant de ce fait une fonction nutritive majeure [131, 132].

La matrice osseuse comprend une phase organique en plus d'une phase minérale. La phase organique est composée à 90% de microfibrilles de collagène de type I, de protéoglycanes, ainsi que de 3 molécules impliquées dans la minéralisation de la matrice : l'ostéocalcine, l'ostéopontine ainsi que l'ostéonectine. La phase minérale, quant à elle, est constituée de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium cristallisé) et de carbonates de calcium. Les ions calcium et phosphates sont situés en surface de ces cristaux et participent à des échanges rapides avec le liquide interstitiel et donc avec le courant sanguin. Ainsi, l'os contient 98 % du calcium de l'organisme [131].

Quatre principaux types cellulaires constituent ce tissu (figure 10) : les cellules bordantes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Les cellules bordantes sont des ostéoblastes au repos. Certaines de ces cellules conservent un état quiescent tandis que d'autres se redifférencient en ostéoblastes. Les ostéoblastes sont les cellules ostéoformatrices. Situées au niveau des surfaces externe et interne du tissu osseux, ce sont les seules cellules de l'organisme capables de synthétiser la matrice osseuse calcifiée à l'origine de la rigidité à l'os. L'activité ostéoformatrice des ostéoblastes s'achève soit par leur apoptose ou alors par leur différenciation en ostéocytes [131]. Les ostéocytes (90% de toutes les cellules osseuses), sont des cellules osseuses dendritiques matures qui contrôlent les ostéoblastes et les ostéoclastes pour maintenir l'homéostasie osseuse [136]. Enfin, les ostéoclastes sont impliqués dans le remodelage osseux se produisant pendant la croissance, le développement ou la réparation de fractures. Contrairement aux autres cellules osseuses qui sont dérivées de cellules fibroblastiques, les ostéoclastes sont dérivés des monocytes circulants. Ce sont de grandes cellules multinucléées et hautement mobiles, capables de se déplacer à la surface du tissu osseux d'un site de résorption à un autre. L'équilibre de cette composition est essentiel à l'homéostasie des tissus osseux [17, 131, 132].

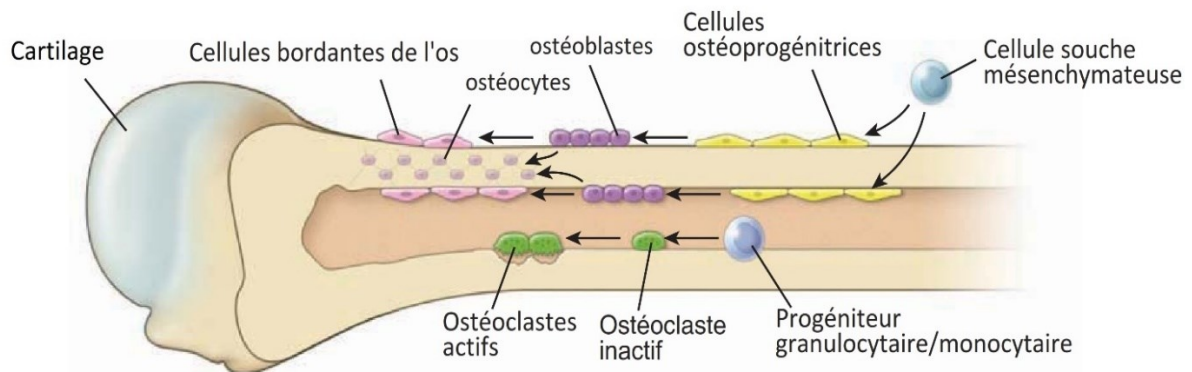


Figure 10. Représentation des cellules osseuses.

Toutes les cellules sauf les ostéoclastes proviennent de la tige mésenchymateuse. Les cellules mésenchymateuses se différencient en cellules ostéoprogénitrices, en ostéoblastes et enfin en ostéocytes et en cellules tapissées. Les ostéoclastes proviennent des cellules progénitrices hématopoïétiques. Adaptée de [131]

4.1.3 La membrane synoviale

La synoviale est le nom donné au tissu mou tapissant des cavités articulaires. Identique aux autres tissus conjonctifs d'enrobage, elle est faite d'un mélange de fibres élastiques et de tissus adipeux [133].

Constituée principalement de deux types cellulaires; les synoviocytes de type A (macrophagiques) et les synoviocytes de type B (fibroblastiques), la membrane s'organise en deux couches distinctes; la couche profonde fortement vascularisée et la couche superficielle fibroblastique à l'origine de la synthèse de l'acide hyaluronique [137].

La membrane synoviale constitue une barrière de filtration et de défense de l'articulation et assure les échanges entre le liquide synovial et le sang. En outre, elle joue un rôle majeur dans la nutrition et la trophicité du cartilage articulaire, principalement par le biais de la sécrétion du liquide synovial [133, 137].

Ce liquide correspond à un dialysat sélectif du plasma auquel manquent les protéines de poids moléculaire élevé. Seules les petites molécules parviennent au cartilage par simple diffusion ou imbibition favorisée par la mobilité de l'articulation. Le liquide synovial est riche en acide hyaluronique à l'origine de sa viscosité. Il a ainsi pour rôle de lubrifier les surfaces articulaires et ainsi favoriser leur glissement lors des mouvements [137].

4.2 L'homéostasie articulaire

L'homéostasie articulaire désigne l'équilibre entre la biosynthèse ou l'anabolisme et la dégradation ou le catabolisme des tissus articulaires.

4.2.1 L'homéostasie du cartilage

Dans un cartilage mature tout est parfaitement autorégulé : la survie des chondrocytes, l'équilibre synthèse/destruction de la matrice, ainsi que son architecture. Le catabolisme est assuré par différentes familles de protéases dont les plus importantes sont les métalloprotéinases matricielles (MMP). Principales enzymes impliquées dans la dégradation de la MEC, elles sont capables de dégrader l'ensemble des protéines matricielles comme la fibronectine, le collagène de type II, les protéoglycanes, l'acide hyaluronique et la protéine matricielle oligomérique du cartilage (COMP). Leur activité est ordinairement faible et augmente pendant les mécanismes de réparation ou de remodelage, mais aussi dans les conditions pathologiques, telles que l'OA ou la RA [138].

Outre les MMP, on retrouve les ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) et ADAMT (*ADAM with a Thrombospondin motifs*). Les ADAM peuvent cliver des cytokines, des facteurs de croissance, des récepteurs ou des molécules d'adhésion. Les ADAMT dégradent les protéoglycanes et les collagènes I, II et III et sont importantes pour la disposition normale du collagène au sein de la MEC [138].

Certaines cytokines anaboliques classées en tant que facteurs de croissance interviennent dans le maintien de l'intégrité du cartilage, essentiellement avec des fonctions de différenciation des chondrocytes et de réparation du cartilage. Parmi eux, on note l'IGF-1, certains membres de la famille du TGF- β , la protéine morphogénétique osseuse (BMP) ainsi que d'autres membres de la famille du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) [139-142].

4.2.2 L'homéostasie de l'os

L'équilibre entre l'érosion osseuse induite par les ostéoclastes et l'anabolisme osseux assuré par les ostéoblastes est primordial à l'homéostasie osseuse. La résorption, suivie de la formation du tissu osseux, s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage où ostéoclastes et ostéoblastes sont étroitement associés [143]. Sous l'action de facteurs ostéorésorbants tels que l'hormone parathyroïdienne (PTH), la résorption osseuse est activée. Elle débute par le recrutement des pré-ostéoclastes qui, une fois différenciés en ostéoclastes fonctionnels sous l'effet de plusieurs facteurs de croissances tels que le M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*), enclenchent le cycle de résorption. Une fois la résorption terminée, les ostéoclastes stimulent le recrutement des ostéoblastes qui initient la phase de formation osseuse [144].

En plus du M-CSF, le RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), son récepteur RANK et l'ostéoprotégérine (OPG), jouent un rôle majeur dans la régulation de l'activité des ostéoclastes et donc dans le remodelage osseux. Le RANKL stimule l'activation, la différenciation et l'adhérence à l'os des ostéoclastes. Son récepteur le RANK, est présent principalement sur les ostéoclastes et les cellules dendritiques. Son activation mène à l'expression de plusieurs gènes spécifiques stimulant les ostéoclastes [145].

De son côté, l'OPG est exprimée de façon constitutive par une grande variété de cellules dont les ostéoblastes. L'OPG exerce une action inhibitrice sur la différenciation et l'attachement à l'os des ostéoclastes. Elle favorise également leur apoptose [146]. Par ailleurs, elle agit comme un « *decoy receptor* » sur RANKL en empêchant sa liaison à RANK. Tel que la figure 11 l'illustre, les ostéoblastes ont donc la double fonction de recrutement des ostéoclastes par l'expression à leur surface du RANK et d'inhibition de leur maturation par la sécrétion de l'OPG. L'équilibre entre l'expression de ces deux médiateurs régit le remodelage osseux [144, 145].

La régulation de la masse osseuse par l'axe RANK/RANKL/OPG dépend d'une multitude de cytokines et hormones. La vitamine D, les glucocorticoïdes, la PTH, la PGE₂, le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6, entre autres, stimulent le RANKL. À l'opposé, le TGF- β et les

œstrogènes accroissent la production d'OPG. Enfin, la calcitonine et le TGF- β peuvent agir directement sur les ostéoclastes et les inhiber [147, 148].

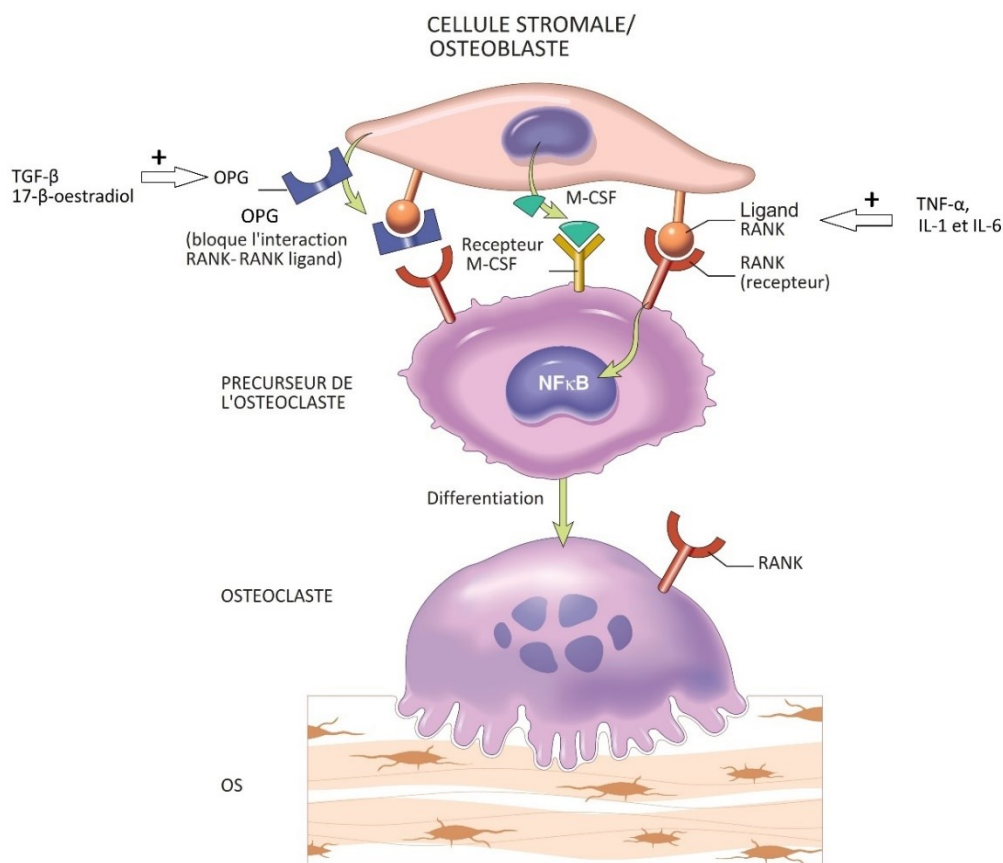


Figure 11. Mécanismes régulant la formation et la fonction des ostéoclastes.

Le RANKL associé à la membrane des ostéoblastes se lie à son récepteur le RANK situé à la surface des cellules des précurseurs des ostéoclastes. Cette interaction, avec le M-CSF, conduit à la formation d'ostéoclastes fonctionnels. Les ostéoblastes sécrètent également de l'OPG qui agit comme un récepteur « leurre » pour RANKL, l'empêchant de se lier au récepteur RANK. Adaptée de [17]

Quand la balance entre le catabolisme et l'anabolisme articulaire est bien équilibrée l'homéostasie est bien préservée. Dans l'OA et la RA, ou encore dans l'ostéoporose, cet équilibre se rompt en faveur d'un catabolisme accru et/ou un anabolisme insuffisant conduisant à des processus de destruction de l'os et du cartilage en plus de l'inflammation synoviale [149, 150].

4.3 Les pathologies articulaires

4.3.1 L'arthrose

L'OA a pendant longtemps été considérée comme la conséquence directe de l'usure et de l'érosion du cartilage articulaire. Or, cette définition a été lentement mais profondément reconsidérée au cours des vingt dernières années. Aujourd'hui, il n'est plus tout à fait juste de qualifier l'OA comme une simple conséquence de l'usure du cartilage articulaire. C'est, à vrai dire, une pathologie ostéoarticulaire multi-tissulaire impliquant l'ensemble des tissus articulaires. Régie par des mécanismes physiopathologiques complexes ayant trait au cartilage, à l'os sous-chondral, à la membrane synoviale et aux tissus adjacents, elle se manifeste par une dégradation du cartilage, une sclérose osseuse sous-chondrale, une inflammation synoviale, un relâchement ligamentaire et un affaiblissement des muscles périarticulaires [151-153].

Bien que l'étiologie de l'OA ne soit pas encore précisément établie, les manifestations biologiques, morphologiques et cliniques sont similaires chez la plupart des patients. Elle affecte généralement les articulations portantes comme celles des genoux, des hanches, du cou et de la colonne vertébrale, mais aussi celles des mains et des doigts, le plus souvent de manière non symétrique. Cliniquement, elle se manifeste par une douleur chronique, une raideur et une limitation des mouvements [151].

L'OA, ainsi que la douleur et l'instabilité articulaire qui en résultent, causent un handicap et une invalidité majeurs chez les personnes atteintes et sont à l'origine d'un lourd tribut social et économique [154].

4.3.1.1 Épidémiologie

Selon le rapport de l'Alliance de l'Arthrite du Canada (AAC), produit en automne 2011, l'OA est la forme d'arthrite la plus courante. Elle touche plus de Canadiens que toutes les autres formes d'arthrite combinées. Affectant environ un adulte Canadien sur huit, soit 13% de la population avec une prévalence plus élevée chez les femmes que chez les hommes, c'est en effet l'une des maladies chroniques les plus répandues [154].

En raison de l'espérance de vie croissante, de l'activité physique réduite, des taux élevés d'obésité et du manque d'accès aux soins de santé en temps opportun, le nombre de personnes qui en souffriront est appelé à croître au cours des prochaines décennies. Les études estiment à près de 5 millions les Canadiens qui en sont actuellement atteints et à plus de 10 millions ceux qui le seront vers l'an 2035, soit une personne sur quatre ou un nouveau diagnostic d'OA toutes les 60 secondes [154].

4.3.1.2 Retentissement socio-économique

Quelle que soit la cause de l'OA, son impact social et économique est bien accepté par tous. En effet, bien qu'elle ait souvent été décrite comme une maladie invisible, l'OA est considérée comme l'une des causes majeures d'invalidité au monde [155, 156]. Son impact significatif sur l'invalidité à long terme et sur la force de travail canadienne ne peut être ignoré. Son fardeau aussi bien en terme social qu'économique doit être souligné.

Selon l'AAC, ce fardeau a été estimé en 2010, à 27,5 milliards de dollars en coûts directs et indirects des soins de la santé, à 195 milliards de dollars en 2015 et devrait atteindre 400 milliards de dollars en 2020 [154].

4.3.1.3 Facteurs de risque

L'OA peut être décrite de diverses manières en se basant sur des observations cliniques et radiographiques. Cependant, il existe peu de preuves scientifiques concordantes sur l'étiologie de cette pathologie. On peut toutefois classer l'OA sous deux différentes formes. L'OA primaire ou idiopathique ayant une forte composante héréditaire et l'OA secondaire, autrement appelée OA post-traumatique, faisant généralement suite à des insultes articulaires.

L'OA primaire et secondaire semblent avoir différentes origines, néanmoins plusieurs facteurs de risque contribuant à leur apparition et à leur développement ont été fermement identifiés. Ils peuvent être scindés en facteurs de risque non modifiables tels que l'âge, le sexe, la génétique et la race, entre autres, et en facteurs modifiables tels que le surpoids, le stress mécanique et le mode de vie, entre autres [155-157].

4.3.1.4 Physiopathologie

Bien que l'étiologie de l'OA ne soit pas encore clairement définie, il est actuellement bien reconnu que les bases physiopathologiques de l'OA vont au-delà de la simple « usure du cartilage ». Plusieurs études ont montré que bien que la destruction du cartilage soit la composante majeure influençant la progression irréversible de l'OA, le remodelage de l'os sous-chondral ainsi que l'inflammation synoviale sont des composantes tout aussi critiques [152], leur intensité étant fortement corrélée au pronostic de la maladie [158, 159].

Au niveau du cartilage, un catabolisme accru et /ou un anabolisme insuffisant peut être induit par le stress mécanique, les cytokines inflammatoires ou tout autre facteur prédisposant cité ci-haut. Il se produit alors une activation inflammatoire caractérisée par la production de cytokines pro-inflammatoires particulièrement l'IL-1 β et le TNF- α , d'enzymes protéolytiques et particulièrement la MMP-13, de PG notamment la PGE2, de la COX-2, du monoxyde d'azote (NO) et des ROS [160, 161]. Tout ceci résulte en une perte considérable des protéoglycanes et une dégradation du réseau de collagène conduisant à la dégénérescence du tissu cartilagineux [160, 162].

Par ailleurs, le remodelage de l'os sous-chondral s'accélère avec une augmentation des os ostéoïdes et une réduction de la minéralisation osseuse conduisant à l'épaississement des extrémités osseuses et la formation marginale d'ostéophytes [159].

D'autre part, la membrane synoviale peut être le siège de phénomènes inflammatoires complexes. Il aura fallu une décennie avant que la synovite ne soit acceptée comme une caractéristique essentielle de l'OA. La membrane synoviale arthrosique est caractérisée par une infiltration de leucocytes et une synthèse accrue de chimiokines, de cytokines et de MMP entretenant la réaction inflammatoire et le catabolisme articulaire [163].

4.3.1.5 Inflammation et arthrose

Initialement non reconnue, la composante inflammatoire à l'origine des symptômes communs de l'OA est maintenant bien affirmée. Elle peut être à l'origine, mais peut également être une conséquence d'un métabolisme articulaire défaillant. Dans tous les cas, elle est retrouvée à la fois aux stades précoces et avancés de la maladie [164].

4.3.1.5.1 Rôle des cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires les plus incriminées dans la pathogénèse de l'OA semblent être l'IL-1 β et le TNF- α [165].

L'IL-1 β induit l'expression génique des MMP et des ADAMT et est fortement associé, en plus de la MMP-1, la MMP-3, la MMP-8 et la MMP-13 à la dégradation de la MEC [166]. En outre, l'IL-1 β et le TNF- α induisent la synthèse de la PGE2 en stimulant l'expression génique et l'activité de la COX-2 ainsi que de la PGE synthase-1 microsomale (mPGES-1) et régulent positivement la production du NO par la monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS). Ils peuvent également induire d'autres cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ainsi que leur propre synthèse. Dans les chondrocytes arthrosiques, ces effets sont médiés par l'activation de certaines voies de signalisation, notamment celles de NF- κ B et MAPK [160, 167].

En effet, plusieurs études décrivent les rôles de l'IL-1 β et de TNF- α dans la pathogénèse de l'OA. Par exemple, l'expression du récepteur p55 du TNF- α a été associée à des sites de perte de protéoglycanes dans le cartilage humain arthrosique [168]. En outre, l'augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-1 β est associée à une production accrue de MMP par les chondrocytes arthrosiques *in vitro* [169]. Enfin, Glasson et al. [170] ont rapporté que des souris transgéniques IL-1 β ^{-/-} ne développent pas l'OA dans un modèle d'instabilité du ménisque induite par chirurgie.

4.3.1.5.2 Rôle des cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires occupent également une place importante et s'opposent à l'action des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 semblent être les principales cytokines anti-inflammatoires impliquées dans l'OA. Elles inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires et des MMP. De plus, l'IL-4 inhibe la synthèse de la PGE2, de la COX-2 et de l'iNOS [171, 172], l'IL-10 stimule la synthèse du Collagène de type II et de l'aggrécane [173]. Enfin, l'IL-13 augmente la production de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) [165].

4.3.1.5.3 Rôle de la COX-2 et de la PGE2

À l'instar des cytokines, la COX-2 et la PGE2 jouent un rôle important dans les réactions inflammatoires dans l'OA. En effet, des niveaux protéiques de COX-2 et de PGE2, au moins 50 fois plus élevés, sont retrouvés dans le cartilage et dans la synoviale humains arthrosiques par rapport aux tissus sains [174, 175]. La PGE2 contribue au catabolisme articulaire par l'inhibition de l'expression du collagène, l'activation des MMP mais aussi par la potentialisation de la résorption osseuse en stimulant l'activité des ostéoclastes [176, 177].

4.3.1.5.4 Rôle des MMP

Tel que discuté dans la section précédente, les MMP ont un rôle direct dans le catabolisme du cartilage et contribuent notablement à la pathogénèse de l'OA. En effet, la synoviale et le cartilage des patients souffrant d'OA montrent une activité exacerbée de plusieurs MMP, la MMP-13 étant la principale enzyme impliquée dans la dégradation du collagène de type II [178]. En réponse à cette activité aberrante, il se produit une activation de la synthèse des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP) qui est néanmoins insuffisante pour neutraliser les actions cataboliques accrues des MMP [160].

4.3.1.5.5 Rôle du NO

Les niveaux plus élevés de NO retrouvés dans les liquides synoviaux humains des patients atteints d'OA renseignent sur le rôle important que joue ce médiateur dans la maladie [179]. La libération du NO conduit à la formation du radical peroxy-nitrite à l'origine de réponses pro-apoptotiques et pro-inflammatoires des chondrocytes [180]. Dans ces cellules, le NO est non seulement cytotoxique, mais exerce en plus un effet catabolique majeur [181, 182]. L'inhibition de l'iNOS et donc de la production du NO, est à l'origine d'une diminution significative de la production de facteurs cataboliques tels que MMP et le peroxy-nitrite, ainsi qu'une suppression marquée de la destruction du cartilage [183, 184].

4.3.1.5.6 Rôle du stress oxydatif

Le stress oxydatif, à son tour, contribue de façon majeure dans la pathogénèse de l'OA. Certaines études montrent que la diminution concomitante de la réponse antioxydante protectrice dans l'articulation conduit à l'apoptose des chondrocytes par activation des caspases

[185]. À l'inverse, le traitement du cartilage avec un agent antioxydant a montré un effet protecteur contre les effets induits par le stress oxydatif sur la sénescence et le dysfonctionnement des chondrocytes et donc sur les lésions du cartilage [186].

4.3.1.6 Prise en charge thérapeutique de l'OA

En dépit de sa fréquence dans la population, les modalités thérapeutiques de l'OA se limitent à des traitements pharmacologiques symptomatiques ou à la chirurgie lorsque la qualité de vie des patients est altérée. Les objectifs des traitements pharmacologiques sont de maîtriser la douleur et d'optimiser la mobilité et la capacité fonctionnelle et ainsi améliorer la qualité de vie [187].

Les mesures non pharmacologiques reposent sur les règles hygiéno-diététiques avec deux piliers essentiels: la pratique de l'activité physique et la bonne hygiène alimentaire.

La prise en charge pharmacologique consiste en l'utilisation d'analgésiques par voie topique (AINS topiques), d'analgésiques par voie systémique (l'acétaminophène, les AINS et les antalgiques opioïdes faibles), ainsi que des agents par voie injectable (infiltrations intra-articulaires de corticoïdes ou d'acide hyaluronique), telle que décrite au tableau III.

Par ailleurs, les produits de santé naturels qui auraient un intérêt dans la prise en charge de l'OA sont principalement la glucosamine, la chondroïtine et le collagène hydrolysé. Actuellement, les données sur les bénéfices de la supplémentation en glucosamine et en chondroïtine, seules ou en association, ne sont toujours pas concluantes. En effet, malgré l'existence d'études cliniques montrant que la chondroïtine et la glucosamine offrent un bon profil d'innocuité et d'efficacité chez des patients atteints d'OA [188, 189], de nombreuses revues systématiques et méta-analyses n'ont démontré aucun bénéfice de la glucosamine et / ou de la chondroïtine exogènes pour le traitement de l'OA [190-194]. Il va de même pour le collagène hydrolysé [195]. Ces produits ne sont donc pas recommandés pour le traitement de l'OA par manque de données. Cependant, les patients qui prennent ces suppléments et qui ont constaté des améliorations ne doivent pas cesser de les prendre du fait que ces suppléments sont sans danger à prendre à long terme [196].

Rappelons qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement pour renverser la progression ou guérir l'OA [197].

Le traitement chirurgical est envisagé en dernier recours lorsque la qualité de vie des patients se dégrade malgré un traitement antalgique bien mené. Il consiste à remplacer, de manière partielle ou totale, l'articulation endommagée par un matériel synthétique [187].

Il existe de ce fait un besoin non encore satisfait en nouvelles thérapies visant à ralentir et à arrêter la dégradation du cartilage, voire induire une régénération des tissus.

	Traitements pharmacologiques	Traitements non pharmacologiques
Traitements locaux	<ul style="list-style-type: none"> ○ AINS topiques ○ Infiltration de cortisone et d'acide hyaluronique 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Physiothérapie ○ Canne, genouillères, semelles plantaires ○ Chirurgie
Traitements systémiques	<ul style="list-style-type: none"> ○ Acétaminophène ○ AINS ○ Antalgiques opioïdes faibles 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Exercices ○ Hygiène alimentaire

Tableau III. Stratégies thérapeutiques de l'OA

4.3.2 L'arthrite rhumatoïde

La RA est une maladie inflammatoire systémique, auto-immune et chronique. Pouvant affecter toutes tranches d'âge, elle se caractérise par une inflammation importante de la synoviale et une destruction majeure et irréversible des tissus articulaires. Se manifestant le plus souvent au niveau des poignets et des doigts, d'autres articulations peuvent être touchées comme les pieds et les orteils, les genoux, les hanches, le cou, les coudes et les épaules [189-191].

L'arthrite se traduit par une ankylose et une douleur articulaire et évolue en poussées entrecoupées de rémissions. Étant une maladie inflammatoire par excellence, ses symptômes sont plus volontiers présents le matin [190, 191]. Au fil de son évolution, la RA conduit à des déformations articulaires mais aussi à des atteintes extra-articulaires pouvant toucher les systèmes cardiovasculaire, pulmonaire, rénal et nerveux. Enfin, la RA est malheureusement associée à une forte baisse de l'espérance de vie [189, 192].

4.3.2.1 Épidémiologie

Selon le rapport de l'AAC publié en automne 2011 [154], la RA est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Elle affecte environ 1% de la population mondiale, avec un ratio femme : homme de 3:1.

4.3.2.2 Retentissement socioéconomique

Selon ce même rapport [154], les coûts de la RA estimés en 2011 étaient de plus de 2 milliards de dollars en dépenses de santé directes et à plus de 3 milliards de dollars en coûts indirects. Ces dépenses devraient atteindre cumulativement près de 95 et de 163 milliards de dollars, respectivement, d'ici l'an 2040.

4.3.2.3 Facteurs de risque

Bien que son étiologie exacte demeure inconnue, il est largement admis que la RA est une pathologie multifactorielle, impliquant plusieurs facteurs de risques. La composante génétique est assez importante, même si l'incidence chez les jumeaux homozygotes n'est que de 10-15%. Les gènes les plus incriminés sont ceux du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) impliqués dans la présentation des antigènes du soi au système

immunitaire. Par ailleurs, l'âge semble être un facteur prédisposant, le pic d'apparition de la maladie se situant vers 45 ans. En outre, la maladie est deux à trois fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, ce qui suggère que le sexe peut influencer l'apparition de la maladie. Enfin, certaines études suggèrent que la fumée de tabac joue un rôle très important. En effet, la RA est plus fréquente, plus grave et répond moins au traitement chez les fumeurs [193, 194].

4.3.2.4 Physiopathologie

La RA est une maladie systémique aux caractères inflammatoire et auto-immun particuliers. Bien que les connaissances sur sa pathogénèse aient progressé de manière importante au cours des dernières années, les mécanismes déclenchant le processus pathologique de la RA restent mal identifiés. Une réponse inflammatoire aberrante, des autoantigènes des composants articulaires comme le collagène de type II, ou encore des peptides exogènes issus de bactéries ou de virus, seuls ou associés aux facteurs prédisposants cités plus haut, peuvent être les éléments déclencheurs [189, 195]. Des réponses immunitaires innées et acquises sont alors activées et conduisent à la formation du pannus, soit une prolifération pseudo-tumorale du tissu synovial. C'est la lésion élémentaire responsable de la destruction des tissus articulaires [196-198].

La synoviale normale est une structure paucicellulaire, en revanche, la synovite rhumatoïde est infiltrée par de nombreuses cellules comprenant principalement des macrophages ainsi que des lymphocytes T et des lymphocytes B [198, 199].

4.3.2.4.1 Rôle des macrophages

Tel que développé dans le chapitre 1, les macrophages sont au cœur de la physiopathologie de l'inflammation, particulièrement dans la RA. Ils sont abondants dans la membrane synoviale et à la jonction cartilage-pannus [200].

Dans la RA, les macrophages sont activés et surexpriment des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance, tels que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13 et le M-CSF ainsi que des agents chimio-attractants comme l'IL-8 et la MCP-1 en plus des MMP et sont

les principaux producteurs du TNF- α . Enfin, les macrophages contribuent également à la progression de la maladie en produisant des ROS et des NOS [199, 201].

Par ailleurs, ils induisent une infiltration de lymphocytes T via la présentation de l'antigène. Cette action peut déclencher une infiltration subséquente de cellules B et la production d'immunoglobulines, ainsi que la sécrétion d'autres facteurs qui auront des effets rétroactifs positifs sur les macrophages et les fibroblastes [202, 203].

En plus de leur rôle central dans l'inflammation, les macrophages sont à l'origine de l'érosion osseuse pathologique de la RA en raison de leur différenciation excessive en ostéoclastes par l'action de RANKL et M-CSF, renforcée par le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 [203].

L'importance des macrophages dans la RA est reflétée par la corrélation entre la progression radiologique de la destruction articulaire et le degré d'infiltration des macrophages synoviaux [204]. De plus, l'épuisement des macrophages a des effets bénéfiques chez les modèles animaux de RA [205].

4.3.2.4.2 Rôle des lymphocytes T

Les lymphocytes T jouent un rôle crucial dans la pathogénèse de la RA. Les macrophages interagissent in situ avec les lymphocytes T en leur présentant des peptides antigéniques associés aux molécules du CMH. Les lymphocytes T se différencient alors en Th1 qui participent à l'activation et à l'entretien de la réaction immunitaire en produisant l'IFN- γ , l'IL-2 ou l'IL-17 [206]. L'importance des lymphocytes T dans la pathogénèse de la RA est étayée par les niveaux élevés de lymphocytes T activés et mémoires dans les liquides synoviaux des patients RA [207]. De plus, des études ont montré que les cellules T humaines activées expriment RANKL et peuvent induire une ostéoclastogénèse à partir de monocytes périphériques [208], laissant croire à l'existence d'un mécanisme unificateur entre l'activation des cellules T, la production de cytokines, l'activation des ostéoclastes et la destruction articulaire.

4.3.2.4.3 Rôle des lymphocytes B

De leur côté, les lymphocytes B interviennent autant dans la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T que dans la production de cytokines comme le TNF- α ou l'IL10.

D'autre part, et surtout, les lymphocytes B produisent des auto-anticorps tels que le facteur rhumatoïde (RF) ou les anticorps anti-protéines citrullinées. Ces derniers sont pathognomoniques de la maladie et participent aux mécanismes lésionnels de la RA [209].

4.3.2.4.4 Rôle des ostéoclastes et de RANKL

La RA est marquée par des érosions osseuses focales, une ostéoporose périarticulaire, en plus d'une perte osseuse généralisée [210, 211]. Chez les individus en bonne santé, la résorption osseuse par les ostéoclastes est compensée par la formation osseuse ostéoblastique, tandis que dans la RA l'activité des ostéoclastes est induite de manière chronique [211-213]. En effet, la destruction osseuse chez les rats arthritiques a été fortement corrélée à l'augmentation du nombre d'ostéoclastes [214]. De plus, dans le modèle de l'arthrite induite par l'adjuvant, le RANKL est exprimé à la surface des cellules T synoviales isolées au début de l'arthrite et induit l'érosion osseuse par l'activation des ostéoclastes. L'inhibition de RANKL via l'OPG supprime, au contraire, la perte de la densité minérale osseuse dans les articulations de ces animaux [215].

4.3.2.4.5 Rôle des cytokines inflammatoires

L'activation immunitaire intense est à l'origine d'une production excessive de cytokines pro-inflammatoires. Beaucoup d'études appuient l'implication des cytokines dans la pathogénèse de la RA. Le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 ayant particulièrement été soulignés, agissent sur différentes cellules immunitaires et composantes articulaires et constituent les cytokines clés de l'inflammation et la dégradation articulaire, observées dans la RA [216, 217]. Leur neutralisation par des thérapies ciblées, permet d'une part, d'inhiber la réaction inflammatoire et d'autre part, de contrôler la destruction ostéoarticulaire, appuyant ainsi leur rôle non seulement dans les processus inflammatoires mais aussi dégénératifs de la maladie [218, 219].

4.3.2.5 Prise en charge thérapeutique de la RA

Comme pour l'OA, les mesures non pharmacologiques sont de règle, reposant principalement sur l'activité physique ainsi que sur l'hygiène alimentaire.

Les traitements pharmacologiques comprennent schématiquement: les traitements symptomatiques (antalgiques et AINS) et les antirhumatismaux modificateurs de la maladie

(ARMM). Ces derniers comportent les ARMM conventionnels et les ARMM biologiques (tableau IV); l'objectif thérapeutique de l'un ou de l'autre étant de ralentir la progression de la maladie et d'atténuer l'inflammation et la douleur [43, 220, 221].

Bien que les vingt dernières années aient connu un essor considérable de traitements par ces agents, la réelle preuve de leur efficacité n'est seulement observable que sur environ la moitié des patients. De plus, ces traitements, souvent de longue durée, sont assez coûteux (des dizaines de milliers de dollars par patient par année) et ont des effets secondaires lourds et difficiles à maîtriser [222-224]. Il y a de ce fait un besoin urgent d'améliorer la prise en charge et la thérapie de la RA.

Traitements symptomatiques	Traitements antirhumatismaux modificateurs de la maladie (ARMM)	
	ARMM conventionnels	ARMM biologiques
<ul style="list-style-type: none"> ○ Acétaminophène ○ AINS ○ Antalgiques opioïdes faibles 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Méthotrexate ○ Hydroxychloroquine ○ Sulfalazine ○ Léflunomide ○ Sels d'or ○ Minocycline ○ D-pénicillamine ○ Azathioprine ○ Cyclosporine 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Inhibiteurs du TNF-α, ex : etanercept, et infliximab ○ L'inhibiteur du récepteur de l'IL-6 : tocilizumab. ○ L'inhibiteur de la voie de costimulation des lymphocytes : abatacept ○ L'anticorps monoclonal anti-lymphocytes B : rituximab ○ L'inhibiteur du récepteur de l'IL-1 : anakinra ○ L'inhibiteur des Janus Kinases : tofacitinib

Tableau IV. Traitements pharmacologiques de la RA [220, 225].

4.4 La résolution de l'inflammation et les pathologies articulaires

L'impact de l'échec de la résolution de l'inflammation sur l'apparition et /ou le développement des maladies inflammatoires, et plus particulièrement articulaires, est une notion qui ne peut être précisément appréciée à l'heure actuelle [56]. Néanmoins, on peut affirmer qu'une résolution défailante contribue en grande partie à la physiopathologie de ces maladies. Au niveau articulaire, ceci a été étudié par quelques équipes de recherche. D'abord les nombreuses études rapportant les bienfaits de la supplémentation en AG ω -3 chez les patients atteints de RA ou d'OA [64, 65, 68]. Ensuite, celles mettant en évidence l'implication des enzymes ou des récepteurs de la résolution dans l'apparitions et /ou la prévention des lésions articulaires [70, 71]. D'autres rapports soulignent l'implication des SPM au niveau articulaire. Citons à titre d'exemple, l'étude de Barden et al. [84] qui ont constaté que, dans les liquides synoviaux articulaires des patients souffrant d'arthrite, les concentrations élevées de RvE2 sont associées à des scores plus faibles de douleur. Ou encore, l'étude de Norling et al. [93], qui montre que la 17 (R)-RvD1, réduit l'infiltration des leucocytes au niveau articulaire et améliore les signes cliniques de la RA dans le modèle K/BxN chez la souris. Ils ont en outre démontré une protection contre la dégradation du cartilage *in vitro*. Par ailleurs, Lima-Garcia et al. [226] ont indiqué que la 17 (R) -RvD1 a également des effets positifs contre la douleur dans un modèle de douleur arthritique induite par l'administration intra-plantaire de l'adjuvant complet de Freund. Enfin, le traitement intra-articulaire avec la RvD1 ralentit la progression de l'OA du genou dans un modèle d'OA associée à l'obésité chez la souris. Il diminue l'infiltration de macrophages dans la synoviale et atténue la gravité de la synovite ainsi que de la dégradation du cartilage [227]. Toutefois, malgré les avancées réalisées par ces études, d'autres recherches demeurent nécessaires afin de mieux apprécier l'implication des médiateurs pro-résolutifs dans la pathogénie articulaire.

Hypothèses du projet de recherche

Exploiter les concepts et les mécanismes de résolution de l'inflammation est une approche innovante pour le traitement des pathologies inflammatoires. Cette nouvelle avenue pourrait aider à répondre aux besoins thérapeutiques non satisfaits des maladies inflammatoires, notamment celles affectant l'articulation. De plus, le rôle proactif que joue la RvD1 dans le contrôle des processus inflammatoires excessifs, mais aussi dans la promotion de la régénération de divers tissus de l'organisme, est indéniable. Toutefois, un manque de données considérable existe sur ses effets sur les composantes articulaires.

Devant le manque de données dans la littérature face aux propriétés de la RvD1 sur le métabolisme ostéoarticulaire, nous voulons clarifier ses propriétés protectrices à ce niveau. Nous avons alors émis l'hypothèse que **la RvD1 exercerait de puissants effets de résolution de l'inflammation sur les processus majeurs impliqués dans la physiopathologie articulaire**. De plus, compte tenu des résultats préliminaires *in vitro* démontrant les effets positifs de la RvD1 sur le cartilage, nous voulons étudier ses actions sur le tissu osseux. Nous avons émis l'hypothèse que **la RvD1 aurait un effet d'inhibition de la résorption osseuse**. Les résultats positifs des premières expériences, justifiant l'étude de l'implication de la RvD1 dans la protection des tissus articulaires *in vivo*, notre troisième hypothèse stipule que **les effets positifs de la RvD1 observés *in vitro* et *ex vivo* seraient reproduits *in vivo* dans un modèle murin de RA en limitant les lésions articulaires, principalement la dégradation du cartilage et la résorption osseuse**.

Objectifs du projet de recherche

Objectif général

Étudier les effets pro-résolutifs de la RvD1 sur l'inflammation et la dégradation des tissus articulaires.

Objectifs spécifiques

- 1- Évaluer les effets de la RvD1 sur la régulation des médiateurs principaux impliqués dans l'inflammation, le catabolisme, l'apoptose et le stress oxydatif des chondrocytes arthrosiques humains, *in vitro*. Ces médiateurs incluent la COX-2 et son produit la PGE2, l'iNOS et son produit le NO, et la MMP-13, en plus des caspase-3 et -9, de la lactate déshydrogénase (LDH), de la Bcl-2, de l'AKT et du glutathion réduit (GSH).
- 2- Étudier les effets de la RvD1 sur le recrutement et l'activation des ostéoclastes *in vitro*, ainsi que sur la résorption de la matrice osseuse *ex vivo*, en évaluant l'expression de TRAP (*Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*) et de la cathepsine K, ainsi que celle des cytokines pro- et anti-inflammatoires, de même que celle de RANKL.
- 3- Étudier les effets de la RvD1 sur les tissus articulaires *in vivo*, dans le modèle CAIA chez la souris.

SECTION 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES

Article 1

Titre

The role of resolvin D1 in the regulation of inflammatory and catabolic mediators in osteoarthritis

Auteurs

Houda Benabdoune, Elsa-Patricia Rondon, Qin Shi, Julio Fernandes, Pierre Ranger, Hassan Fahmi et Mohamed Benderdour.

Publié dans la revue

Inflammation Research. 2016 Aug;65(8):635-45

Résumé de l'article 1 en français

Le rôle de la résolvine D1 dans la régulation des médiateurs inflammatoires et cataboliques impliqués dans l'arthrose

La RvD1, un dérivé des AG ω -3, a montré des propriétés remarquables dans la résolution de l'inflammation ainsi que dans la réparation et la préservation de l'intégrité tissulaire. Dans cette étude, nous évaluons les effets de la RvD1 sur les processus majeurs impliqués dans la physiopathologie de l'OA. Les niveaux de la RvD1 ont été mesurés par dosage immunoenzymatique dans les liquides synoviaux des genoux provenant du modèle expérimental d'OA chez le chien, obtenus d'une étude antérieure. Les chondrocytes arthrosiques humains ont été traités avec 1 ng / ml d'IL-1 β ou avec 20 μ M de HNE, en présence ou non de concentrations croissantes de RvD1 (0 à 10 μ M). La viabilité cellulaire était évaluée par le test 3-(4,5-diméthylthiazoyle)-2,5-diphényl-SH-tétrazolium-bromure. Les médiateurs de l'inflammation, du catabolisme et de l'apoptose ont été déterminés par dosage immuno-enzymatique, Western blot, et qPCR. Le GSH a été évalué par un kit commercial. L'activation de la MAPK et de NF- κ B a été évaluée par Western blot. Nous avons montré que les niveaux de la RvD1 sont plus élevés dans les liquides synoviaux des articulations arthrosiques par rapport aux articulations saines. Sur les chondrocytes arthrosiques humains, nous avons démontré que les doses utilisées de la RvD1 ne sont pas toxiques pour les cellules. Par ailleurs, la RvD1 inhibe l'expression de la COX-2, de la PGE2, de l'iNOS, du NO et de la MMP-13, induite par l'IL-1 β . L'étude des voies de signalisation a révélé que la RvD1 s'oppose à l'activation de NF- κ B/p65, p38/MAPK et JNK 1/2, induite par l'IL-1 β . De plus, elle prévient l'apoptose cellulaire et le stress oxydatif induits par le HNE, tel qu'indiqué par l'inactivation des caspases, l'inhibition de libération de la LDH et l'augmentation des taux de la Bcl-2 et de l'AKT, ainsi que du GSH. Il s'agit de la première étude *in vitro* démontrant l'effet bénéfique de la RvD1 dans l'OA. Les propriétés démontrées de la RvD1 sur les nombreux facteurs impliqués dans la pathogenèse de l'OA, fait d'elle un agent thérapeutique potentiel pour le traitement et la prévention de la maladie.

The role of resolvin D1 in the regulation of inflammatory and catabolic mediators in osteoarthritis

Houda Benabdoune^{1,2}; Elsa-Patricia Rondon²; Qin Shi²; Julio Fernandes²; Pierre Ranger²; Hassan Fahmi³ and Mohamed Benderdour^{1,2}

¹ Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada;

² Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montreal, QC, Canada

³ Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

Running title: The role of RvD1 in osteoarthritis

Keywords: Osteoarthritis, inflammation, resolvin D1, catabolism, apoptosis, oxidative stress.

Address reprint requests and other correspondence to Dr. Mohamed Benderdour, Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Room K-3045, 5400 Gouin Blvd. West, Montreal (QC) Canada H4J 1C5; Telephone: (514) 338-2222 (Extension 3279); Fax: (514) 338-2694. Email: mohamed.benderdour@umontreal.ca

ABSTRACT

OBJECTIVE AND DESIGN: Resolvin D1 (RvD1), an omega-3 fatty acid derivative, has shown remarkable properties in resolving inflammation, promoting tissue repair and preserving tissue integrity. In this study, we investigated RvD1 effects on major processes involved in osteoarthritis (OA) pathophysiology.

MATERIALS AND METHODS: Human OA chondrocytes were treated with either 1 ng/ml interleukin-1 β (IL-1 β) or 20 μ M 4-hydroxynonenal (HNE), then treated or not with increased concentrations of RvD1 (0-10 μ M). RvD1 levels were measured by enzyme immunoassay in synovial fluids from experimental dog model of OA and sham operated dogs obtained from our previous study. Cell viability was evaluated by 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide assay. Parameters related to inflammation, catabolism and apoptosis were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, and quantitative polymerase chain reaction. Glutathione (GSH) was assessed by commercial kit. The activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor-kappaB (NF- κ B) pathways was evaluated by Western blot.

RESULTS: We showed that RvD1 levels were higher in synovial fluids from OA joint compared to controls. In OA human chondrocytes, we demonstrated that RvD1 was not toxic up to 10 μ M and stifled IL-1 β -induced cyclooxygenase 2, prostaglandin E2, inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, and matrix metalloproteinase-13. Our study of signalling pathways revealed that RvD1 suppressed IL-1 β -induced activation of NF- κ B/p65, p38/MAPK and JNK^{1/2}. Moreover, RvD1 prevented HNE-induced cell apoptosis and oxidative stress, as indicated by inactivation of caspases, inhibition of lactate dehydrogenase release, and increased levels of Bcl2 and AKT, as well as GSH.

CONCLUSION: This is the first in vitro study demonstrating the beneficial effect of RvD1 in OA. That RvD1 abolishes a number of factors known to be involved in OA pathogenesis renders it a clinically valuable agent in prevention of the disease.

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is a common, degenerative and irreversible osteo-articular disease causing severe pain and impaired joint function and leads to devastating and debilitating effects on millions of lives [1]. Its incidence will likely increase in the coming decades as the population ages and the obesity rate rises [2]. Moreover, OA is now considered as one of the most important causes of disability in the world. It has a significant impact on mobility, labour force and activities of daily living [3]. The burden of OA is in fact physical, psychological and socioeconomic. Given its high frequency in the population, it is costly to society, in both personal and economic terms [2].

Although OA has been designated as "wear and tear" of the cartilage, it is finally perceived as a complex dysfunction of the whole joint, connecting cartilage, sub-chondral bone and synovial membrane [3]. If many risk factors such as age, weight, ethnicity and family history have been well identified, the mechanisms on the cellular level, leading from the presence of risk factors to joint dysfunction, are not entirely understood [4]. Nonetheless, it has been reported that, in OA cartilage, the balance between synthesis and degradation of extracellular matrix is disturbed, promoting in turn catabolic and inflammatory pathways. Among factors involved in OA process are cartilage-degrading metalloproteinases, mainly the metalloproteinase-13 (MMP-13), and the pro-inflammatory mediators such as cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin-E2 (PGE₂), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and nitric oxide (NO) [5;6]. Furthermore, chondrocyte death by apoptosis appears to play a central role in altering the cartilage along with oxidative stress [7;8]. Many authors have implicated this latter point in the pathophysiology of OA by focusing on its impacts not only on the catabolism, but also on the aging of the cartilage [9;10].

At present, there is no cure for OA [11]. Its management is broadly divided among non-pharmacological, pharmacological, and surgical treatments. Pharmacological management is symptomatic and consists mainly of pain control. Surgical management is generally reserved for failed medical management where functional disability affects the patient's quality of life [12-14].

In the past few years, growing evidence has shown that the shift from inflammatory to non-inflammatory status is not a passive but an active regulated program designated as resolution of inflammation [15]. It is actually an active process in which numerous mediators, such as lipoxins, resolvins and protectins, are endogenously biosynthesized in a specific way, at distinct times and

locations, during the inflammatory course [16], in the purpose of tissue repair as well as preserving tissue integrity and homeostasis [17;18]. Resolvins are lipid derivatives, generated from omega-3 polyunsaturated fatty acids, more specifically after sequential enzymatic transformations of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) producing series of E resolvins (RvE) and D resolvins (RvD), respectively [19]. RvD are produced by the enzymatic action of 15-lipoxygenase-1 (15-LO) followed by 5-lipoxygenase (5-LO) to generate several chemically distinct bioactive compounds (RvD1-RvD6) [20;21]. This work focuses specifically on RvD1. RvD1 has shown interesting anti-inflammatory effects and has been effective not solely in the resolution of acute, but also chronic inflammation [22;23].

The concept of blocking the inflammatory process and even reversing it by promoting resolution of inflammation in the joints represents a novel and very promising approach in the treatment of OA. Assuming that RvD1 has a protective effect on OA chondrocytes, the overall objective of this work is to demonstrate the anti-inflammatory, anti-catabolic and anti-apoptotic actions of RvD1 on OA chondrocytes.

MATERIALS AND METHODS

Specimen selection and Cell culture

Human chondrocytes were obtained from OA patients who underwent total knee arthroplasty. Informed consent had been obtained from OA patients for the use of their tissues for research purposes. Experimental protocols and use of human tissues were approved by the Research Ethics Board of the Hôpital du Sacré Coeur de Montréal.

OA cartilage was obtained in aseptic conditions and carefully isolated from the underlying bone, sliced then rinsed with phosphate buffered saline (PBS), as described previously [24]. OA chondrocytes were extracted by sequential enzymatic digestion for one hour with 1 mg/ml of protease (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), followed by six hours with 2 mg/ml of collagenase (Sigma-Aldrich) or overnight with 0.5 mg/ml of collagenase at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone), and 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Hyclone). The cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ until they became confluent and ready for the experiment.

Synovial fluids collection

Synovial fluids were obtained within the context of our previous study [25]. Samples were collected by inserting a needle with syringe into the joint space of normal and OA dogs and then centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C. The supernatants were drawn off with sterile Pasteur pipette and then stored at -80°C until use.

Cell treatment

First-passage OA chondrocytes were seeded (at 10⁵ cells/cm²) in tissue culture plates and incubated for 48 hours before experimental procedures. The experiments were performed in DMEM containing 1% FBS and antibiotics with the factors under study. Cells were pretreated with increasing concentrations of RvD1 (1-10 µM, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) for 1 h and then activated with (i) 1 ng/ml interleukin-1β (IL-1β, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) for 24 h or (ii) 20 µM of 4-hydroxynonenal (HNE, Cayman Chemical Company) for 16 and 24 h. The IL1β and HNE are inducers of cellular metabolism and apoptosis of chondrocytes [6;10]. In another set of experiments, cells were treated with increasing doses of

RvD1 (0-10 μ M) or with 10 μ M RvD1 for 1 h followed by another incubation with 1 ng/ml IL-1 β for 30 min or for increasing times of incubation (0-60 min).

RvD1 level measurement

RvD1 level was measured in the synovial fluids from experimental dog model of OA and sham-operated dogs [25] by enzyme immunoassay (EIA). Absorbance was measured with the micro-ELISA Vmax photometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Cell viability Assay

Human OA chondrocytes were treated for 24 and 48 hours with increasing concentrations of RvD1 (1-10 μ M). Cell viability was assessed with MTS assay kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA), as described by the manufacturer. Absorbance was measured with the micro-ELISA Vmax photometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Protein detection by Western blotting

At the end of treatment periods, chondrocytes were lysed and cellular extracts collected then loaded in a 4-12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel for electrophoresis. They were then electroblotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). After protein transfer, membranes were blocked using commercial blocking buffer (Pierce) and then incubated with the following primary antibodies: anti-human iNOS, anti-human Bcl2 (R&D systems), anti-human total phosphorylated p38/MAPK, JNK^{1/2}, NF- κ B/p65, anti-human total and phosphorylated AKT (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-human pro- and active forms of caspase-3 and -9 (Millipore, Billerica, MA, USA), anti-human COX-2 (Cayman Chemical Company). After serial washes, the membranes were incubated with anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA). Immunoreactive bands were visualised with SuperSignal blotting substrate (Life Technologies Inc. Burlington, ON, Canada) and exposed to HyBlot CL film (Harvard Apparatus Canada, Saint-Laurent, QC, Canada).

PGE₂, MMP-13 and NO determination

After treatment, cell supernatant was collected, then, PGE₂, MMP-13 and NO levels were assessed by EIA (Cayman Chemical Company), ELISA kits (R&D Systems), and Greiss reaction, respectively. All assays were performed in duplicate. Absorbance was measured with the micro-ELISA Vmax photometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

RNA extraction and Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen/life technologies) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantitated with a nanophotometer (MBI Lab equipment), dissolved in RNase free water (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and stored at -80°C until use. 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA with Quantitect reverse transcription Kit (Qiagen) as detailed in the manufacturer's guidelines. The reverse transcriptase reaction product was subjected to PCR analysis with QuantiTect Syber Green PCR Kit (Qiagen), according to the manufacturer's guidelines and as described in our previous report [26]. The following specific sense and antisense primers were purchased from Bio-Corp Inc. (Montreal, Qc, Canada): human COX-2, 5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3' (forward) and 5'-AGT TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3' (reverse), human MMP-13, 5'-CTT AGA GGT GAC TGG CAA AC (forward) and 5'-GCC CAT CAA ATG GGT AGA AG (reverse); human iNOS, 5'-ACA TTG ATG AGA AGC TGT CCC AC-3' (forward) and 5'-CAA AGG CTG TGA GTC CAC-3' (reverse); human actin 5'-AGC CTC GCC TTT GCC GA-3' (forward) and 5'-CTG GTG CCT GGG GCG-3' (reverse).

Relative mRNA expression in chondrocytes was quantified according to the $\Delta\Delta C_t$ method, as detailed in our previous report [26]. Each sample was in duplicate for each independent experiment.

Lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione (GSH) determination

Culture medium of cultured OA chondrocytes was collected and LDH levels were measured with specific commercial kits from Cayman Chemical, according to the manufacturer's instructions. Reduced GSH and oxidized GSH (GSSG) were quantified in cellular extracts with a Glutathione Assay Kit (Cayman Chemical Compagny), accodrning, to the manufacturer's directions and as described previously [6]. Values were expressed as the GSSG/GSSG+GSH ratio levels. All

assays were performed in duplicate. Absorbance was measured with the micro-ELISA Vmax photometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Statistical analysis

All quantitative results were calculated as mean \pm SEM. The data were analyzed by Student's t tests and ANOVA, with adjusted correction for multiple comparisons using Tukey tests. $P < 0.05$ values were considered statistically significant.

RESULTS

RvD1 levels are higher in the synovial fluid of OA dogs compared to control animals.

To answer our first objective, we performed initial experiments to verify the presence of RvD1 in synovial fluids obtained from experimental dog model of OA and in sham-operated dogs (control). The development of this model was published in our recent report [25]. Our findings are shown in Figure 1 and revealed that RvD1 levels were 3.5-fold higher in OA synovial fluid compared with control ($P \leq 0.001$).

RvD1 was not cytotoxic in human OA chondrocytes.

This part of the experiment was designed to test the cytotoxic effect of RvD1 on human OA chondrocytes. As illustrated in Figure 2, RvD1 at different concentrations (1-10 μM) did not alter the cell viability after 24 and 48 h of incubation. Moreover, RvD1 (1-10 μM) did not affect the chondrocyte phenotype, as indicated by the expression of type II collagen (data not shown).

RvD1 inhibits the production of inflammatory and catabolic mediators in human OA chondrocytes.

To investigate the anti-inflammatory and anti-catabolic effects of RvD1 in OA chondrocytes, we evaluated its effect on key mediators involved in OA, namely, COX-2, iNOS and their respective products, PGE₂ and NO, as well as on MMP-13. To do so, human OA chondrocytes were treated with increased concentrations of RvD1 (1-10 μM) for 1h then activated with 1 ng/ml of IL-1 β for 24 h. As illustrated in Figures 3 and 4, western blot data shows that RvD1 at 5 and 10 μM , significantly reduces IL-1 β -induced protein and mRNA expression of COX-2, iNOS as well as PGE₂ and NO release. In a similar pattern, MMP-13 expression at protein and mRNA levels was decreased in the presence of RvD1 (Fig. 5). Maximum inhibition of inflammatory and catabolic mediators was achieved with 10 μM RvD1. In another set of experiments, isolated chondrocytes were treated with 1 ng/ml IL-1 β for 1 h and thereafter with 10 μM RvD1 for 24 h. Our findings showed that RvD1 significantly abolished IL-1 β -induced COX-2 and MMP-13 protein expression in a similar pattern (data not shown).

RvD1-dependent inhibition of MAPKS and NF-κB-signalling pathways

To elucidate the signalling pathways that will be modulated by RvD1, we analyzed members of the MAPKs and NF-κB pathways by Western blotting with protein samples from human OA chondrocytes that had been preincubated with 10 μM RvD1 for 1 h, followed by 5, 15, 30, 60, 120 min of stimulation with 1 ng/ml IL-1β or preincubated with increased dose of RvD1 (0-10 μM) followed by another incubation for 30 min in the presence of 1 ng/ml IL-1β. RvD1 at 10 μM had no effect on basal expression of p38 MAPK, JNK^{1/2}, and p65-NF-κB (data not included). However, combined with IL-1β, RvD1 blocked IL-1β-induced p38 MAPK, JNK^{1/2} and NF-κB-p65 phosphorylation with all incubation time periods (Fig. 6A) and in a dose dependent manner (Fig. 6B). Taken together, these findings suggest that RvD1-inhibited inflammatory and catabolic mediators could be attributed, in part, to abrogation of the MAPKs and NF-κB-signalling pathways.

RvD1 prevents apoptosis in OA chondrocytes

In the next set of experiments, we investigated the anti-apoptotic effects of RvD1 on OA chondrocytes, considering apoptosis as an important process involved in the pathogenesis of OA and play a key role in its development and setting [27]. For this purpose, various markers of apoptosis, including caspases-3 and 9, LDH, Bcl2 and AKT, were studied after pre-treatment of OA chondrocytes with RvD1 for 1h, followed by activation with 20 μM HNE. At this concentration, HNE is known to induce apoptosis in chondrocytes [6].

As illustrated in figure 7A, western blot data revealed that RvD1 at 5 and 10 μM blocked HNE-induced activation of caspase-3 and -9. This effect is supported by the progressive increase in caspase-3 and 9 protein cleavage and the progressive decrease in pro-caspase-3 and -9 protein expressions in OA chondrocytes treated with RvD1. The investigation of the expression of anti-apoptotic proteins showed that RvD1 abolished HNE-induced down-regulation of Bcl2 (Fig. 7B). In addition, analysis of cell supernatants showed that RvD1 significantly reduced the release of LDH in a dose-dependent manner, indicating a protective effect against the apoptosis of chondrocytes (Figure 7C).

To study the signalling pathways involved in the protective effect of RvD1 against cell death induced by HNE, we examined the activation of AKT in chondrocytes at different times of incubation and in increasing doses of RvD1. Western blot analysis indicated that RvD1, in a time

and dose dependent manner, prevented HNE-induced AKT inactivation, as depicted by the phosphorylated level of AKT (Fig. 7D). Total AKT was unchanged. Collectively, these results clearly demonstrate the anti-apoptotic effects of RvD1 on OA chondrocytes.

RvD1 has an antioxidant effect in OA chondrocytes

Oxidative stress is an essential element leading to inflammatory and apoptotic processes [28]. To establish whether RvD1 could potentially regulate the oxidative status in OA chondrocytes, we measured the level of GSH after induction of chondrocytes by 20 μ M HNE. At this concentration, HNE decreased the reduced form of GSH in human OA chondrocytes [6]. Figure 8 shows that 10 μ M RvD1 increased of about 2-folds the GSH levels compared to HNE-treated cells, demonstrating the antioxidant effects of RvD1.

DISCUSSION

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disorder and a leading cause of physical disability [29]. Its prevalence is expected to increase significantly in the upcoming decades, as a result of increased life expectancy and population aging. Consequently, it is of greatest social importance that we facilitate advances in the treatment of this musculoskeletal disorder through research, the main goal being to improve disease prevention and treatment. There is currently no effective treatment to prevent or stop cartilage destruction during OA, and relieving OA pain remains a substantial issue. Therefore identification of agents that down-regulate factors known to be involved in OA pathogenesis may prove to be useful for the prevention or treatment of OA.

Over the past decades, the inflammatory cascade has been at the center of the pathophysiological scene of OA disease. What was striking in the last years is the discordance between the enormous volume of data supporting the involvement of inflammatory mediators in OA development and the inconclusive clinical results of exogenous anti-inflammatory therapy [30]. These results highlight the existence of other cellular and molecular pathways linked to inflammation that are not taken into account. In this light, the present study was focused on clarifying the role of a pro-resolving mediator; RvD1, in OA therapy. RvD1 is an endogenous lipid mediator biosynthesized during the resolution phase of inflammation. It is known to have, potent pro-resolving and anti-inflammatory activities. The main results emerging from the present study are that RvD1 plays a key role in the regulation of the major processes involved in OA pathophysiology, including mediators of inflammation, catabolism and oxidative stress. Our observations support the notion that RvD1 administration could decrease cartilage lesions and degradation.

First, in synovial fluids obtained from our experimental dog model of OA, we demonstrated increased levels of RvD1 in OA dog synovial fluids, as compared to controls. This result is consistent with the literature data indicating that RvD1 synthesis is conducted in inflammatory conditions to promote the resolution of inflammation [31].

It is widely established that the resolution of the inflammation process, requires the production of bio-active molecules, able to neutralize pro-inflammatory insults [31]. The biosynthesis and biological effects of these substances can be achieved at local and systemic levels. Among them, RvD1 linked to resolution of inflammation, has attracted considerable research interest during the last decade. The interest for RvD1 seems not only due to its potential use as an indicator of resolution process of inflammation, but also because of increasing data showing that it is able to

regulate a panoply of signal transductions involved in inflammation, oxidative stress and cell death [32]. RvD1 is synthesized physiologically by enzymatic conversion of docosahexaenoic (DHA) by 15- and 5-lipoxygenases (15-LOX and 5-LOX) [33]. Its production has been previously observed in various cell types and tissues, including salivary glands, retina, polymorphonuclear leukocytes, epithelial and endothelial cells, neutrophils, vascular cells, whole blood, and in the brain [33-36]. Moreover, the production of RvD1 is enhanced by aspirin treatments. In fact, it has been reported that aspirin generates 17*R*-HDHA through COX-2 acetylation, which following sequential oxygenation by 5-LOX, results in production of 17-epi-RvD1. The latter is known as aspirin-triggered RvD1 (AT-RvD1) [37;38]. Furthermore, synovial fluid lipid composition was quantified in patients with rheumatoid arthritis [39]. Authors revealed the presence of numerous lipid mediators such as MaR1, RvD5, LXA, 5S,12S-diHETE. In addition, the expression of RvD1-generating enzymes (e.g. 15-LOX and 5-LOX) was reported in articular tissues such as articular cartilage at basal and inducible levels [39;40]. This suggests that these enzymes play an important role in the regulation of inflammatory processes in OA, via pro- and anti-inflammatory mediator's biosynthesis.

Second we assessed RvD1 actions on IL-1 β -induced inflammatory and catabolic mediators in OA chondrocytes. As illustrated in our results, RvD1 significantly reduced IL-1 β -induced COX-2, iNOS and MMP-13 expression as well as PGE₂ and NO generation. Changes in protein expression of COX-2, iNOS and MMP-13 correlate with those of mRNA. In OA, MMP-13, COX-2 and iNOS play a critical role in maintaining cartilage homeostasis [41;42]. Indeed, it has been widely established that their expression levels are higher in OA articular tissues. MMP-13, largely secreted by OA chondrocytes, is involved in type II collagen cleavage [43], and its expression, up-regulated by IL-1 β , IL-17 and TNF- α , COX-2 and iNOS are an early response genes that are rapidly induced, often by IL-1 β and TNF- α and most likely responsible for the elevated PGE₂ and NO levels in OA [42;44;45]. The accumulation of PGE₂ and NO in knee joint plays a key role in OA progression and pain [46].

Third we conducted additional experiments to investigate the signaling pathways of IL-1 β involved in COX-2, iNOS and MMP-13 expression [47]. We demonstrated that RvD1 abolished IL-1 β -induced activation of p38/MAPK, JNK^{1/2} and NF- κ B/p65 signaling pathways. Our findings are in accordance with previous reported data indicating that RvD1 is a potent inhibitor of inflammatory mediators via NF- κ B and p38/MAPK inactivation [48]. Moreover, in murine

macrophage-like RAW264.7 cells, RvD1 treatments markedly reduced LPS-induced TNF- α expression via NF- κ B inactivation. The inhibitory effect of RvD1 on LPS-induced TNF- α expression was associated with concomitant reduction of p65/p50 heterodimer accumulation in the nucleus, as well as proteasomal degradation of NF- κ B [49]. In a murine peritonitis model, the administration of RvD1 abolished the zymosan-A-induced TNF α production [49]. Furthermore, in an experimental model of LPS-induced acute lung injury, it has been reported that RvD1 markedly reduced the LPS-induced expression of COX-2, iNOS, and adhesion molecules, as well as myeloperoxidase activity [50]. Altogether, our data collectively supports the concept that RvD1 could be beneficial to not only oppose inflammation but also to inhibit a number of mediators involved in cartilage degradation.

Fourth, recognizing the important role of apoptosis and oxidative stress in OA [26;27], we tested the hypothesis that RvD1 may prevent cartilage damage through the inhibition of these cellular processes. To do so, different markers of apoptosis, namely caspase-3 and -9, LDH, Bcl2 were evaluated after pretreatment of OA chondrocytes with RvD1 and then with HNE, a very reactive product of lipid peroxidation, known to induce apoptosis in OA chondrocytes [6]. Our results showed that RvD1 blocked caspases activation by HNE and decreased LDH release. In addition, RvD1 abolished HNE-decreased expression of anti-apoptotic factor, Bcl2. Our findings add to the prevailing hypothesis that RvD1 is an anti-apoptotic molecule that, when added exogenously to the cultured cells, modulates numerous mediators of apoptosis, including caspases, LDH, and Bcl2. Moreover, the investigation of activation of apoptotic signal transduction pathways, revealed that RvD1 rapidly abolished HNE-induced AKT inactivation, demonstrated by its phosphorylation levels. These data are in agreement with the recent study of Gilbert et al. [51] showing that RvD1 plays an important role in cardioprotection. In fact, RvD1 treatment reduces infarct size induced by ischemia via a mechanism involving the PI3K/Akt pathway. In HepG2 hepatocytes, Jung et al [32] reported that RvD1 attenuates cell apoptosis through JNK pathway. Collectively, the activation of AKT by RvD1 suggests that RvD1 confers a real cellular protection that may occur upstream of the induction of cell death.

Previous reports have demonstrated that oxidative stress generates a panoply of signalling pathways implicated in various physiological and pathophysiological events of OA [52]. In articular chondrocytes, there is evidence that reactive oxygen species (ROS) are involved as signaling intermediates for TNF- α and IL-1 β [9;53]. It has been suggested that ROS produced

inside the joint may contribute significantly to the pathogenesis of OA, since these inorganic oxidants are able to degrade cartilage via oxidation of ECM components or posttranslational modification of MMPs [54;55]. To investigate this concept, we studied the possibility that RvD1 regulates oxidative stress. Our finding showed that RvD1 increases redox status as indicated by expanded GSH pool. These data are consistent with those of the literature indicating that RvD1 induces GSH synthesis [56]. Overall, the anti-apoptotic and anti-oxidative profile lends support to the notion that RvD1 presents the potential to oppose oxidative stress-induced apoptosis and inflammation, which have been associated to OA.

In conclusion, our results clearly show that RvD1 modulates both inflammation and catabolism responses in OA chondrocytes. Additionally, we observed promising outcomes with RvD1 in the prevention of oxidative stress-induced OA chondrocytes apoptosis, mainly via the restoration of redox status. Our findings strongly suggest that RvD1 may offer a very promising and original approach in targeting OA therapy.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This study was supported Canadian Institute of Health Research grant (#IMH 131570 for Dr Mohamed Benderdour) and by the Center of Excellence for Arthroplasty Research (for Dr Mohamed Benderdour).

REFERENCES

1. Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br Med Bull.* 2013; 105:185-9.
2. Bombardier C. The impact of arthritis in Canada. today and over the next 30 years. *Arthritis Alliance of Canada.* 2011; 606:1-52.
3. Musumeci G, Aiello FC, Szychlińska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci.* 2015; 16:6093-2.
4. Ziskoven C, Jager M, Kircher J, Patzer T, Bloch W, Brixius K, Krauspe R. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011; 89:455-6.
5. Attur M, Krasnokutsky-Samuels S, Samuels J, Abramson SB. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2013; 25:136-4.
6. Vaillancourt F, Fahmi H, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC, et al. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10:R107.
7. Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999; 7:389-1.
8. Takada K, Hirose J, Yamabe S, Uehara Y, Mizuta H. Endoplasmic reticulum stress mediates nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis. *Biomed Rep.* 2013; 1:315-9.
9. Bentz M, Zaouter C, Shi Q, Fahmi H, Moldovan F, Fernandes JC, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2012; 113:2256-7.
10. Mongkhon JM, Thach M, Shi Q, Fernandes JC, Fahmi H, Benderdour M. Sorbitol-modified hyaluronic acid reduces oxidative stress, apoptosis and mediators of

- inflammation and catabolism in human osteoarthritic chondrocytes. *Inflamm Res.* 2014; 63:691-1.
11. Thysen S, Luyten FP, Lories RJ. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Dis Model Mech.* 2015; 8:17-0.
 12. Henrotin Y, Marty M, Appelboom T, Avouac B, Berenbaum F, Briole V et al. Traduction française des recommandations de l'Osteoarthritis Research Society International (OARSI) sur la prise en charge de la gonarthrose et de la coxarthrose. *Revue du rhumatisme.* 2009; 76:279-8.
 13. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007; 15:981-0.
 14. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16:137-2.
 15. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:101-7.
 16. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med.* 2000; 192:1197-4.
 17. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2001; 2:612-9.
 18. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Arita M. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an

- overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2004; 73:155-2.
19. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:349-61.
 20. Kohli P, Levy BD. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol.* 2009; 158:960-1.
 21. Norling LV, Perretti M. The role of omega-3 derived resolvins in arthritis. *Curr Opin Pharmacol.* 2013; 13:476-1.
 22. Kasuga K, Yang R, Porter TF, Agrawal N, Petasis NA, Irimia D, et al. Rapid appearance of resolvins precursors in inflammatory exudates: novel mechanisms in resolution. *J Immunol.* 2008; 181:8677-7.
 23. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev.* 2011; 111:5922-3.
 24. Morquette B, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC, Benderdour M. Production of lipid peroxidation products in osteoarthritic tissues: new evidence linking 4-hydroxynonenal to cartilage degradation. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:271-1.
 25. Shi Q, Abusarah J, Zaouter C, Moldovan F, Fernandes JC, Fahmi H, et al. New evidence implicating 4-hydroxynonenal in the pathogenesis of osteoarthritis in vivo. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66:2461-1.
 26. El-Bikai R, Welman M, Margaron Y, Cote JF, Macqueen L, Buschmann MD, et al. Perturbation of adhesion molecule-mediated chondrocyte-matrix interactions by 4-hydroxynonenal binding: implication in osteoarthritis pathogenesis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R201.
 27. Abella V, Santoro A, Scotece M, Conde J, Lopez-Lopez V, Lazzaro V, Gomez-Reino JJ, Meli R, Gualillo O. Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB 101, PCB 153 and

- PCB 180) induce chondrocyte cell death through multiple pathways. *Toxicol Lett.* 2015; 234:13-9.
28. Sakata S, Hayashi S, Fujishiro T, Kawakita K, Kanzaki N, Hashimoto S, et al. Oxidative stress-induced apoptosis and matrix loss of chondrocytes is inhibited by eicosapentaenoic acid. *J Orthop Res.* 2015; 33:359-5.
 29. Page CJ, Hinman RS, Bennell KL. Physiotherapy management of knee osteoarthritis. *Int J Rheum Dis.* 2011; 14:145-1.
 30. Laev SS, Salakhutdinov NF. Anti-arthritic agents: progress and potential. *Bioorg Med Chem.* 2015; 23:3059-0.
 31. Fredman G, Serhan CN. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem J.* 2011; 437:185-7.
 32. Jung TW, Hwang HJ, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Baik SH, et al. Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 391:30-0.
 33. Lehmann C, Homann J, Ball AK, Blocher R, Kleinschmidt TK, Basavarajappa D, et al. Lipoxin and resolvin biosynthesis is dependent on 5-lipoxygenase activating protein. *FASEB J.* 2015. [Epub ahead of print].
 34. Hong S, Lu Y. Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. *Front Immunol.* 2013; 4:13.
 35. Duffield JS, Hong S, Vaidya VS, Lu Y, Fredman G, Serhan CN, et al. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. *J Immunol.* 2006; 177:5902-1.
 36. Leigh NJ, Nelson JW, Mellas RE, Aguirre A, Baker OJ. Expression of resolvin D1 biosynthetic pathways in salivary epithelium. *J Dent Res.* 2014; 93:300-5.

37. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med*. 2002; 196:1025-7.
38. Sun YP, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, et al. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J Biol Chem*. 2007; 282:9323-4.
39. Giera M, Ioan-Facsinay A, Toes R, Gao F, Dalli J, Deelder AM, et al. Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821:1415-4.
40. Chabane N, Zayed N, Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Human articular chondrocytes express 15-lipoxygenase-1 and -2: potential role in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11:R44.
41. Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest*. 1997; 99:1231-7.
42. Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1998; 10:263-8.
43. 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. *J Clin Invest*. 1997; 99:1534-5.
44. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem*. 1998; 273:27467-3.
45. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum*. 2003; 33:155-7.

46. Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*. 2013; 527:440-7.
47. Wang L, Ma T, Zheng Y, Lv S, Li Y, Liu S. Diosgenin inhibits IL-1beta-induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocytes. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8:4830-6.
48. Xu MX, Tan BC, Zhou W, Wei T, Lai WH, Tan JW, et al. Resolvin D1, an endogenous lipid mediator for inactivation of inflammation-related signaling pathways in microglial cells, prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *CNS Neurosci Ther*. 2013; 19:235-3.
49. Lee HN, Kundu JK, Cha YN, Surh YJ. Resolvin D1 stimulates efferocytosis through p50/p50-mediated suppression of tumor necrosis factor-alpha expression. *J Cell Sci*. 2013; 126:4037-7.
50. Wang B, Gong X, Wan JY, Zhang L, Zhang Z, Li HZ, et al. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther*. 2011; 24:434-1.
51. Gilbert K, Bernier J, Bourque-Riel V, Malick M, Rousseau G. Resolvin D1 Reduces Infarct Size Through a Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B Mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015; 66:72-9.
52. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003; 11:747-5.
53. Ahmad R, Sylvester J, Ahmad M, Zafarullah M. Involvement of H-Ras and reactive oxygen species in proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 507:350-5.
54. Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: a critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010; 174:299-6.

- 55 Tiku ML, Allison GT, Naik K, Karry SK. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003; 11:159-6.
- 56 Cox RJr., Phillips O, Fukumoto J, Fukumoto I, Parthasarathy PT, Arias S, et al. Enhanced Resolution of Hyperoxic Acute Lung Injury as a result of Aspirin Triggered Resolvin D1 Treatment. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015; 53:422-5.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. RvD1 levels are higher in the synovial fluid of OA dogs compared to control animals. Synovial fluids were obtained within the context of our previous study (refer to materials and methods). Levels of RvD1 were measured with an EIA kit (enzyme immunoassay). Student's t-test was performed for the comparison of the results. Results are expressed as mean \pm SEM for $n = 6$. *** $P < 0.001$.

Figure 2. RvD1 did not impair chondrocytes viability. Human OA chondrocytes were incubated with RvD1 at different concentrations (1-10 μ M) for 24 h (A) and 48 h (B). Cell viability was evaluated by 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide assay. ANOVA test was performed to compare the results. Results are expressed as mean \pm SEM for $n=3$.

Figure 3. RvD1 reduced IL-1 β -induced COX-2 expression and PGE₂ release. Chondrocytes were pre-treated with RvD1 (1-10 μ M) for 1 h, then activated with IL-1 β (1 ng/ml) for 24 h. PGE₂ production was measured with an EIA kit in the cell supernatants (A). mRNA (B) and protein expression (C) of COX-2 were analyzed in cell extracts by qRT-PCR and western blot, respectively. ANOVA test was performed to compare the results. Results are expressed as mean \pm SEM for $n=3-5$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ (vs IL-1 β), ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ (vs untreated cells).

Figure 4. RvD1 reduced IL-1 β -induced iNOS expression and NO production. Chondrocytes were treated as described in Figure 2. Cell supernatant was collected, in which NO production was measured with Greiss reagent (A). mRNA (B) and protein expression (C) of iNOS were analyzed in cell extracts by qRT-PCR and western blot, respectively. ANOVA test was performed to compare the results. Results are expressed as mean \pm SEM for $n=4-5$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ (vs IL-1 β), ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ (vs untreated cells).

Figure 5. RvD1 reduces IL-1 β -induced MMP-13 expression. The chondrocytes were treated as described in Figure 2. Cell supernatant was collected and MMP-13 production was measured with an ELISA kit (A). MMP-13 mRNA expression (B) were analyzed in cell extracts by qRT-PCR. ANOVA test was performed to compare the results. Results are expressed as mean \pm SEM for $n=4-5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ (vs IL-1 β), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$ (vs untreated cells).

Figure 6. RvD1 inhibited IL-1 β -induced activation of NF- κ B, p38/MAPK and JNK $^{1/2}$ pathways. Chondrocytes were pre-treated with RvD1 (10 μ M) for 1h, then activated with IL-1 β (1 ng/ml) at different time intervals for 120 min (A), or pre-treated with increasing concentrations of RvD1 (1-10 μ M) for 1h, then activated with IL-1 β (1 ng/ml) for 30 min (B). Cell extracts were collected and the protein expression of phosphorylated forms of NF- κ B, p38/MAPK and JNK $^{1/2}$ were measured by western blot (n=5).

Figure 7. RvD1 inhibited HNE-induced caspases activation and LDH release, but activated AKT pathway. Chondrocytes were pre-treated with RvD1 (10 μ M) for 1 h, then activated by HNE (20 μ M) for 16 h. Cell extracts were collected, in which pro- and active-caspase-3 and -9 were determined by Western blot (A). Cells were treated with RvD1 (0-10 μ M) for 1 h followed by another treatment with 20 μ M HNE for 24 h and Bcl2 (B) and LDH (C) levels were determined by Western blot and commercial kit, respectively. Total and phosphorylated AKT (D) was revealed by Western blot in treated cells with 10 μ M RvD1 for 1 h and then with 20 μ M HNE or with 10 μ M RvD1 alone for increasing times of incubation (0-60 min). (n=2-4). ANOVA test was performed to compare each condition. Results are expressed as mean \pm SEM for n=3. * P < 0.05 (vs untreated cells; # P < 0.05 (vs HNE).

Figure 8. RvD1 increases GSH level in OA chondrocytes activated with 4-HNE. Cells were pre-treated with RvD1 (10 μ M) for 1 h, then activated by HNE (20 μ M) for 16 h. GSH production was assessed in cell extracts by commercial kit. ANOVA test was performed to compare the results. Results are expressed as mean \pm SEM for n=4. ** P < 0.05 (vs HNE), ### P < 0.01 (vs untreated cells).

Figure 1

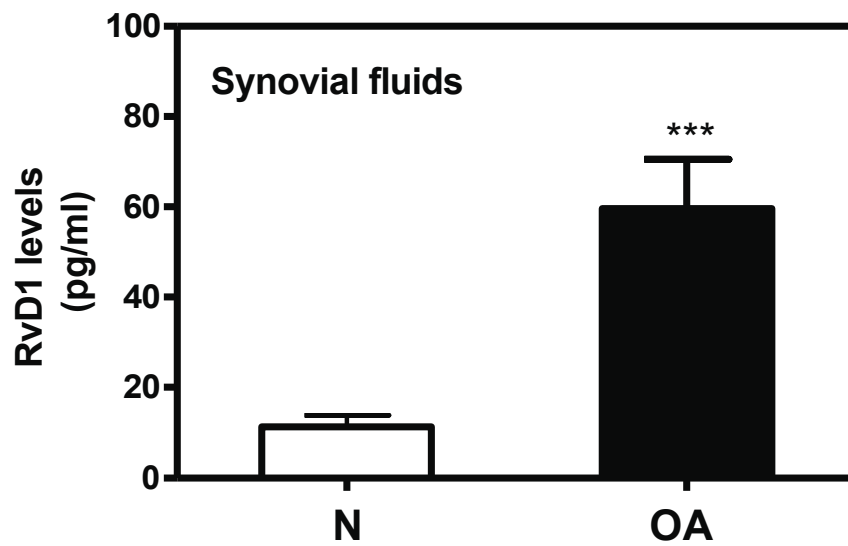


Figure 2

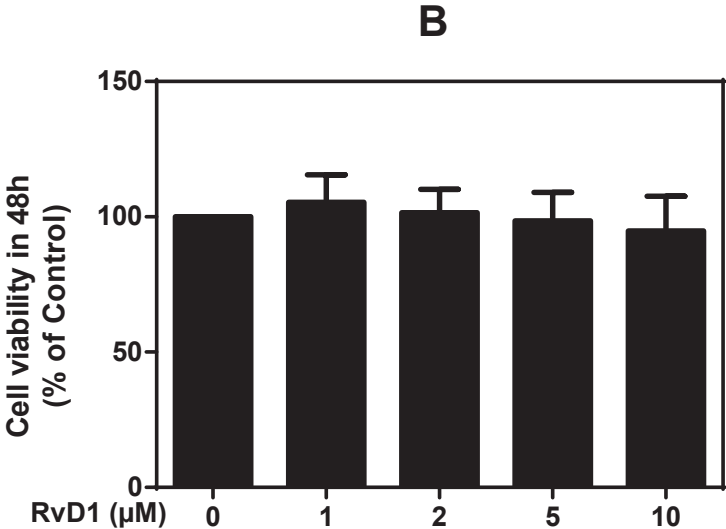
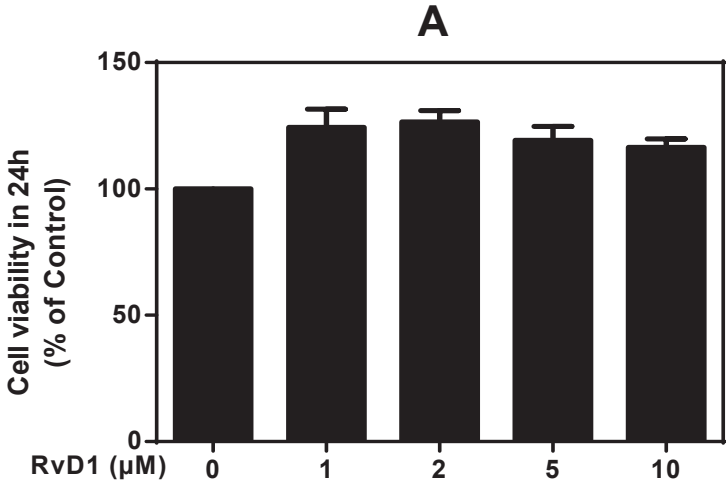


Figure 3

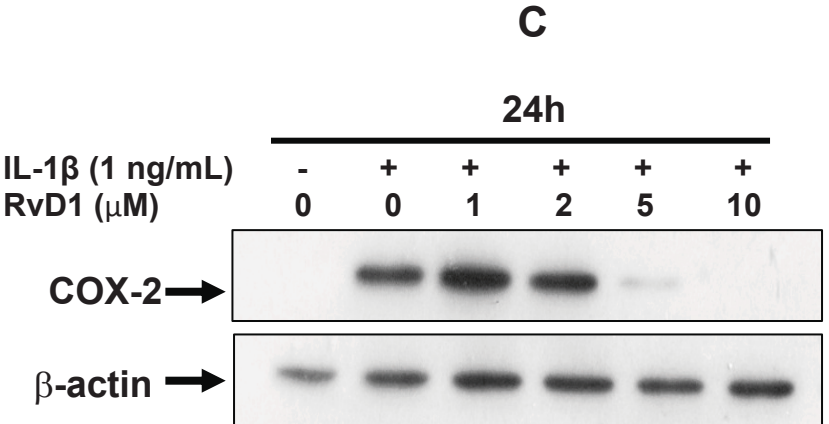
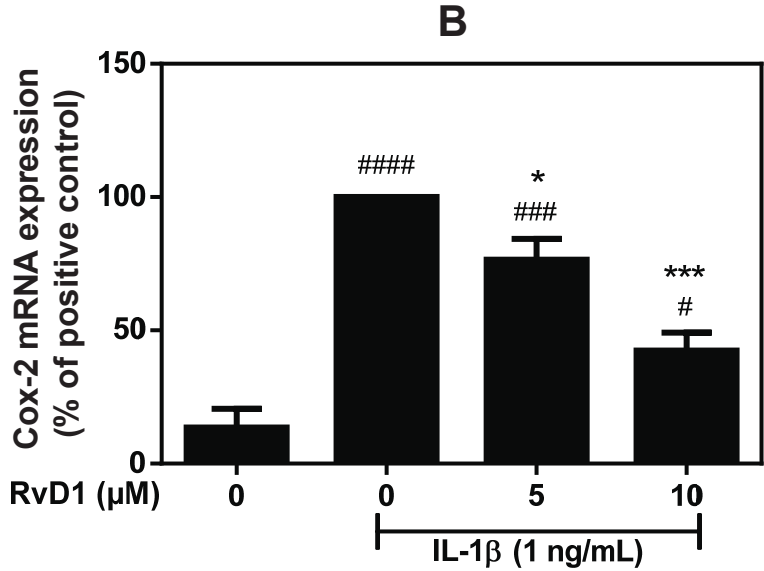
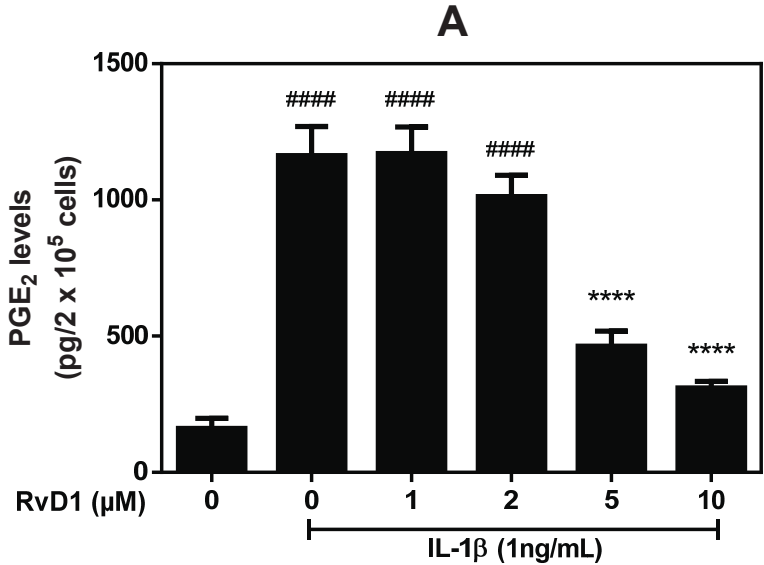


Figure 4

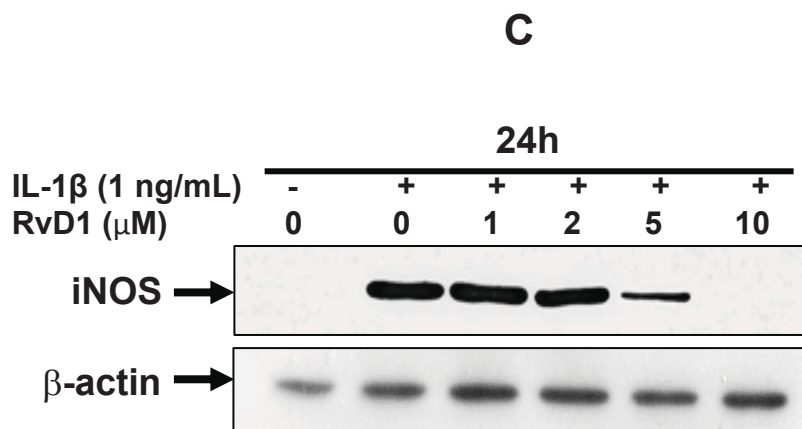
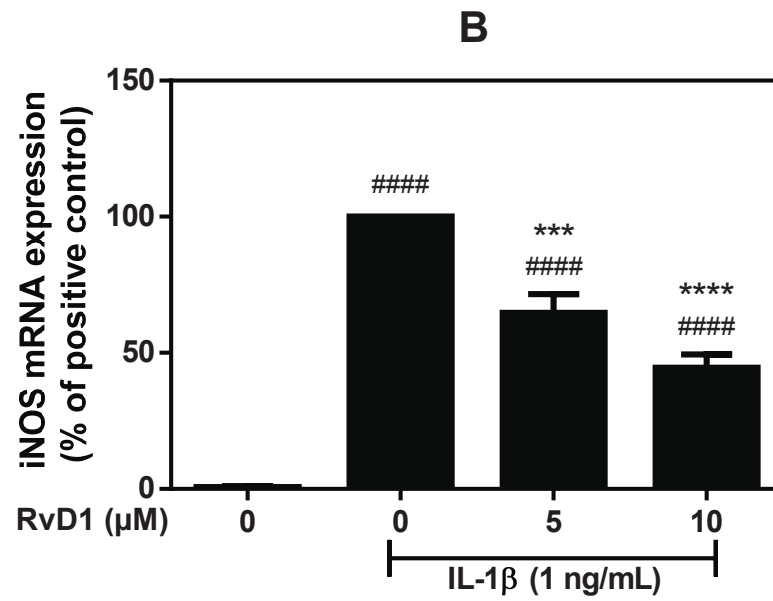
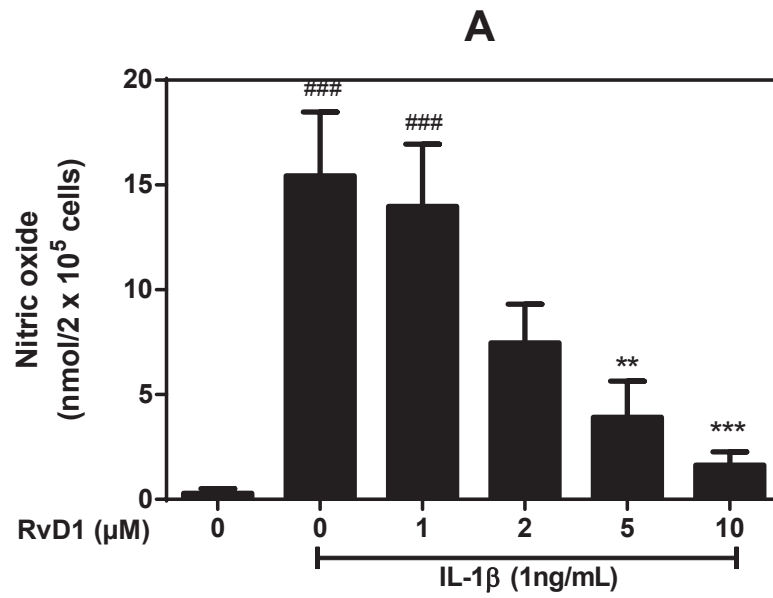


Figure 5

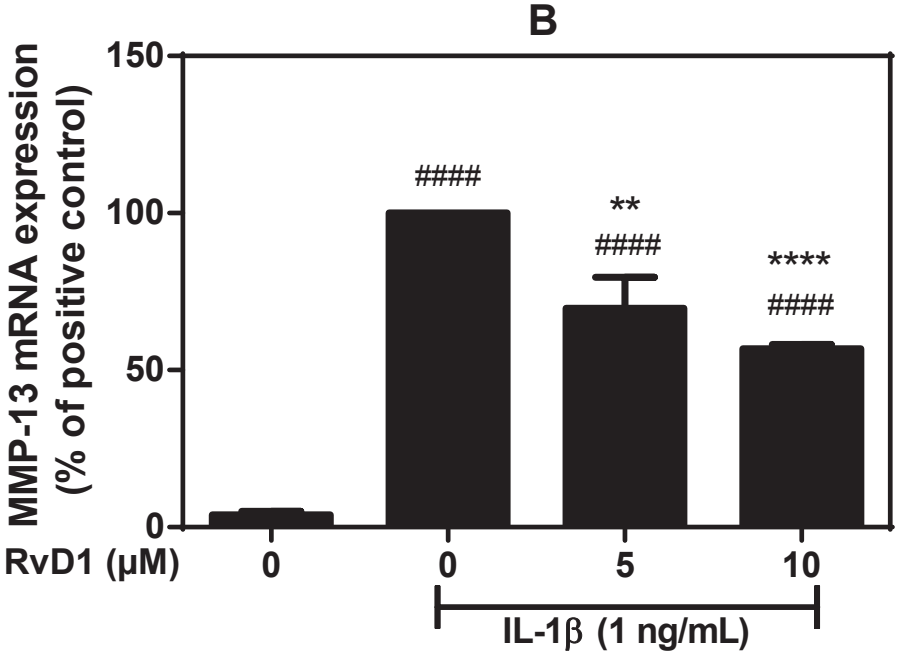
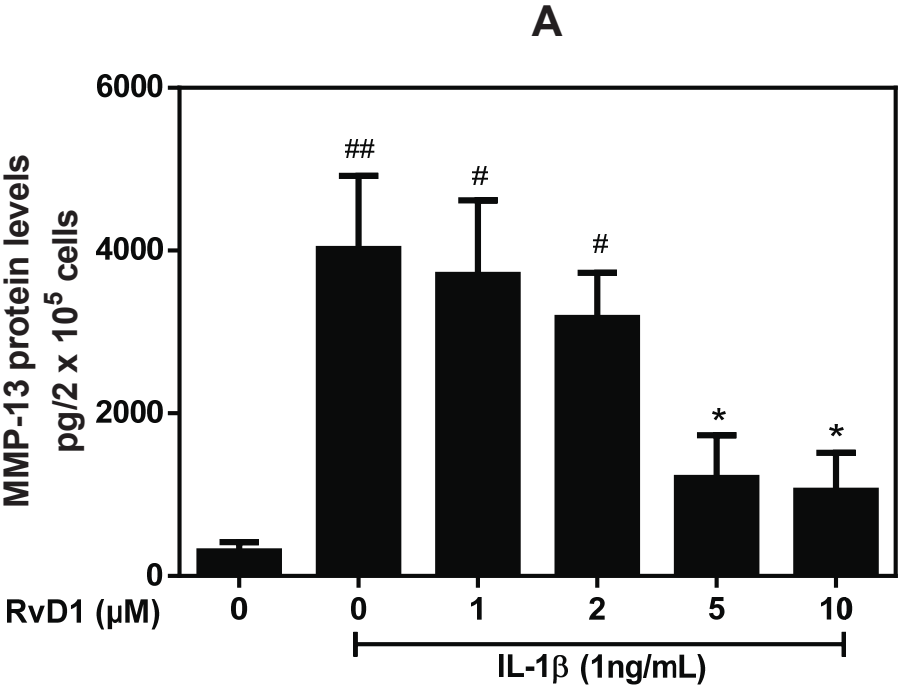


Figure 6

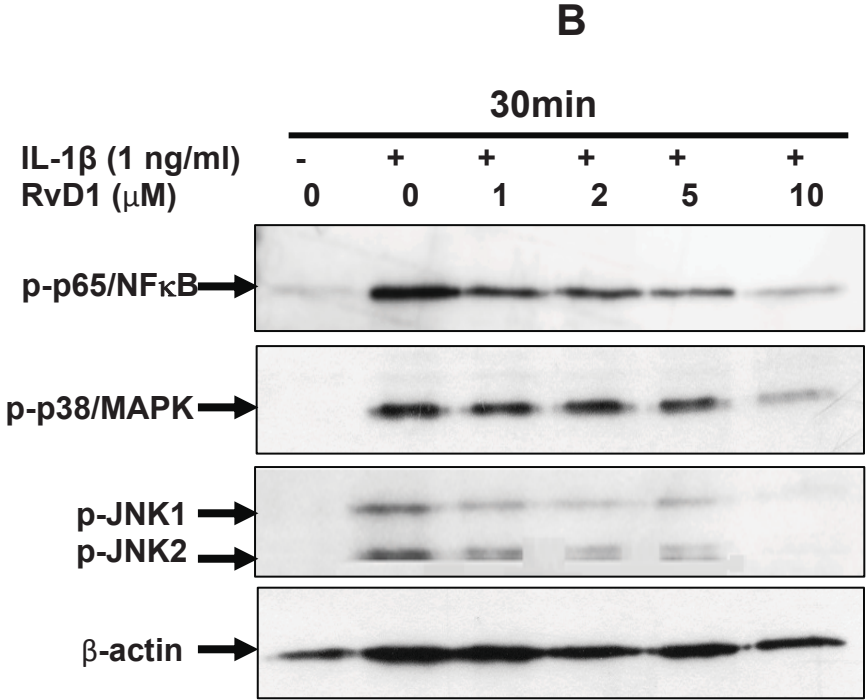
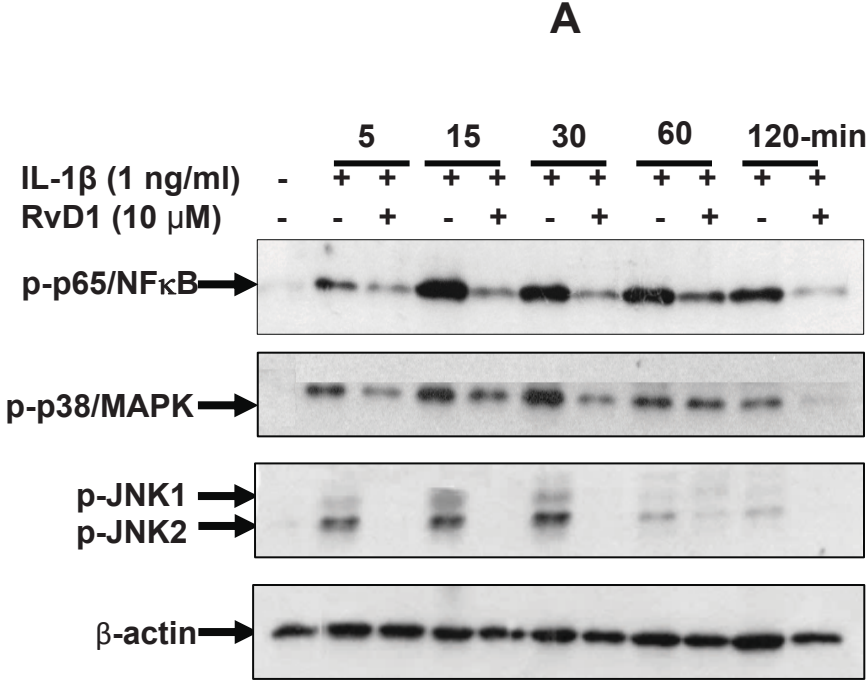


Figure 7

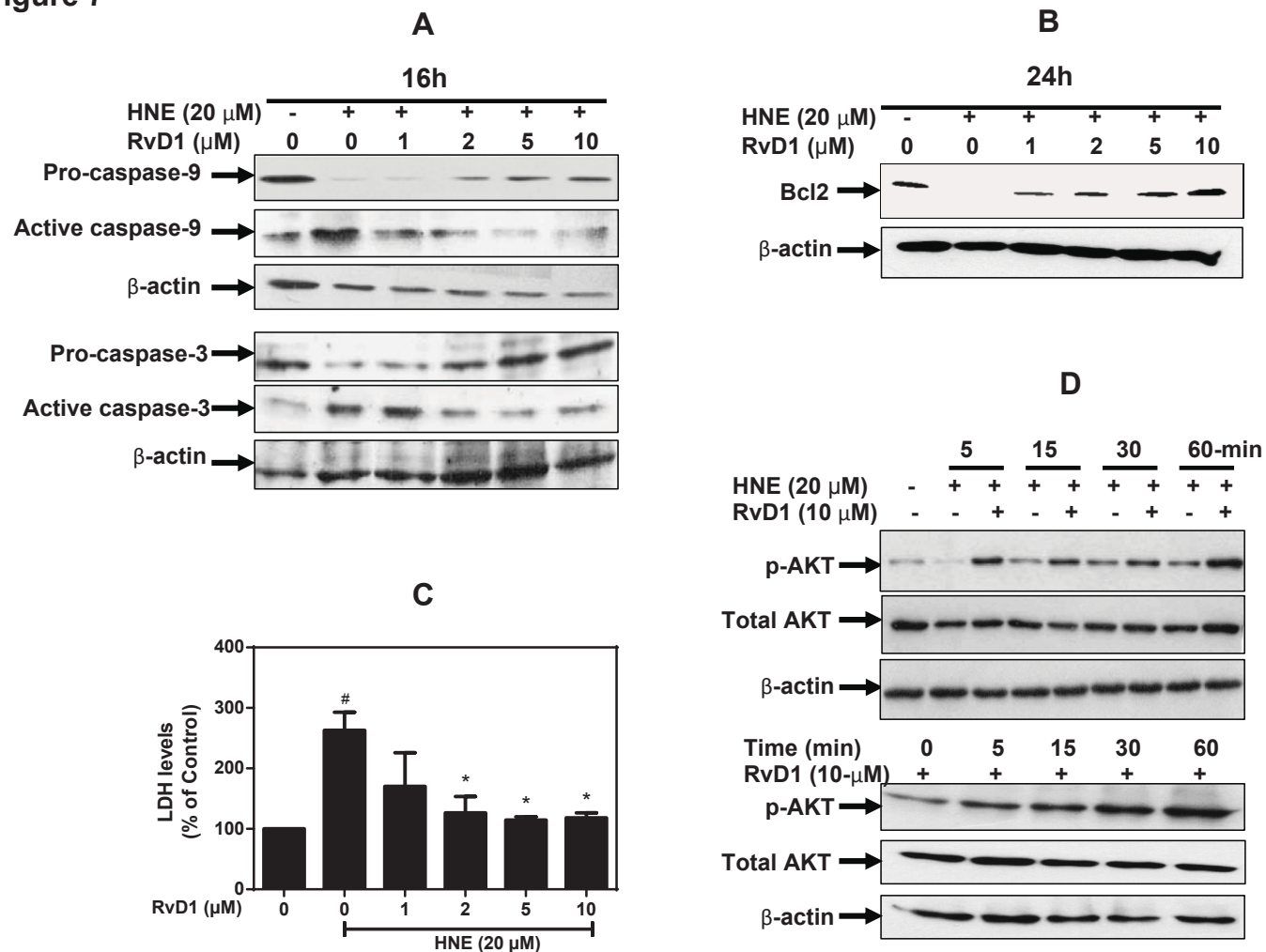
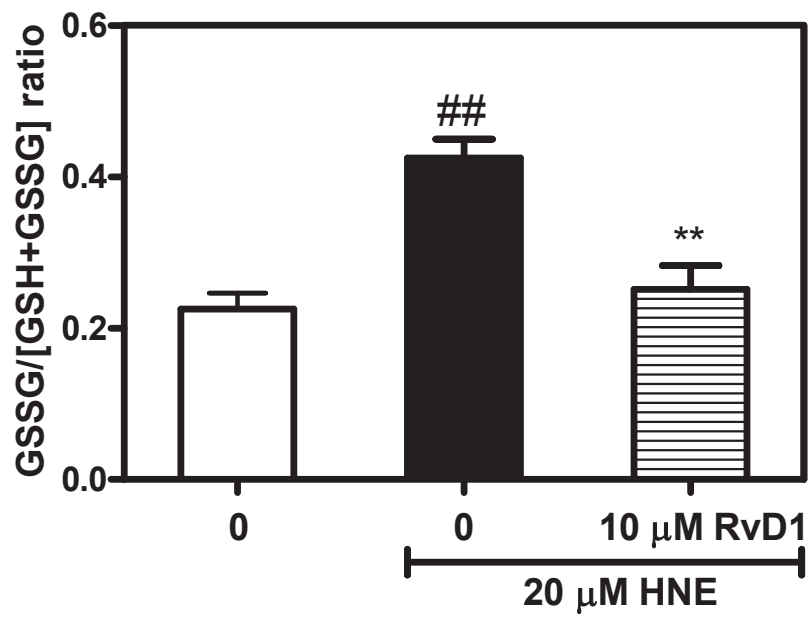


Figure 8



Article 2

Titre

In vitro and *in vivo* assessment of the proresolutive and antiresorptive actions of resolvin D1: relevance to arthritis

Auteurs

Houda Abir Benabdoun, Merve Kulbay, Elsa-Patricia Rondon, Francis Vallières, Qin Shi, Julio Fernandes, Hassan Fahmi et Mohamed Benderdour.

Publié dans la revue

Arthritis Research and Therapy. 2019 Mar 12;21(1):72

Résumé de l'article 2 en français

Étude *in vitro* et *in vivo* des propriétés prorésolutives et antirésorptives de la resolvin D1 : application à l'arthrite.

La RvD1, un membre important des résolvines, exerce un large spectre d'effets biologiques, dont la résolution de l'inflammation, la réparation des tissus et la préservation de la viabilité cellulaire. Le but de la présente étude est d'étudier le potentiel anti-arthritique et clarifier les actions protectrices de la RvD1 sur les os, *in vitro* et *in vivo*. Les cellules RAW264.7 ont été traitées avec 50 ng/ml de LPS pendant 72 h en présence ou en absence de concentrations croissantes de RvD1 (0 à 500 nM). Les monocytes primaires humains ont été traités avec M-CSF + RANKL pendant 14 jours ± RvD1 (0–500 nM) avec ou sans siRNA dirigés contre le récepteur de la RvD1, ALX/FPR2. L'expression des médiateurs inflammatoires et des enzymes cataboliques, le recrutement des ostéoclastes, ainsi que la résorption osseuse ont été analysés. L'effet thérapeutique de la RvD1 (0–1 000 ng) a été évalué dans le modèle CAIA chez la souris, où le score clinique de l'arthrite, l'histologie articulaire et les marqueurs de l'inflammation et du remodelage osseux ont été évalués. La RvD1 n'est pas toxique et inhibe la différenciation et l'activation des ostéoclastes, tel que montré par l'inhibition de l'expression de TRAP et de la cathepsine K. Elle diminue la résorption osseuse, tel que révélé par l'inhibition de la dégradation de la matrice d'hydroxyapatite ainsi que de l'érosion de la matrice osseuse *ex vivo*. De plus, la RvD1 réduit l'expression de TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IFN- γ , de la PGE2 et de RANKL et augmente celle de l'IL-10, chez les ostéoclastes. Chez les souris arthritiques, la RvD1 réduit le score clinique, l'inflammation de la patte et la destruction des os et des articulations. En outre, elle inhibe les médiateurs inflammatoires et diminue significativement les marqueurs sériques du remodelage osseux et cartilagineux. Nos résultats fournissent une preuve supplémentaire que la RvD1 joue un rôle clé dans la prévention de la résorption osseuse ainsi que des autres modifications physiopathologiques associées à l'arthrite. L'étude met en évidence la pertinence clinique de RvD1 en tant qu'agent potentiel pour le traitement de l'arthrite inflammatoire et des troubles osseux associés.

In vitro and in vivo assessment of the proresolutive and antiresorptive actions of resolvin D1: relevance to arthritis

Houda Benabdoun^{1,2}, Merve Kulbay², Elsa-Patricia Rondon², Francis Vallières², Qin Shi², Julio Fernandes^{2,3}, Hassan Fahmi⁴, Mohamed Benderdour^{2,3}.

¹ Department of Pharmacology and physiology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

² Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montreal, QC, Canada.

³ Department of Surgery, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

⁴ Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada; Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

Houda Benabdoun: houda.abir.benabdoune@umontreal.ca

Merve Kulbay: mervekulbay@hotmail.com

Patricia Elsa Rondon: elsa.patricia.rondon-cavanzo@umontreal.ca

Francis Vallières: f.vallieres@umontreal.ca

Qin Shi: qin.shi@umontreal.ca

Julio Fernandes: julio.c.fernandes@umontreal.ca

Hassan Fahmi: h.fahmi@umontreal.ca

Mohamed Benderdour: mohamed.benderdour@umontreal.ca

Running title: The role of RvD1 in arthritis

Keywords: Arthritis, inflammation, resolvin D1, bone resorption, mice.

Address reprint requests and other correspondence to Dr. Mohamed Benderdour, Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Room K-3045, 5400 Gouin Blvd. West, Montreal (QC) Canada H4J 1C5; Telephone: (514) 338-2222 (Extension 3279); Fax: (514) 338-2694. Email: mohamed.benderdour@umontreal.ca

ABSTRACT

BACKGROUND: Resolvin D1 (RvD1), an important member of resolvins, exerts a wide spectrum of biological effects, including resolution of inflammation, tissue repair and preservation of cell viability. The aim of the present study is to investigate the anti-arthritic potential and clarify the bone protective actions of RvD1 *in vitro* and *in vivo*.

METHODS: RAW264.7 cells were treated with 50 ng/ml LPS for 72 h in the presence or absence of RvD1 (0-500 nM). Primary human monocytes were treated with M-CSF + RANKL for 14 days \pm RvD1 (0-500 nM) with or without siRNA against RvD1 receptor FPR2. Expressions of inflammatory mediators, degrading enzymes, osteoclasts (OC) formation, and bone resorption were analyzed. The therapeutic effect of RvD1 (0-1000 ng) was studied out in murine collagen antibody-induced arthritis. Arthritis scoring, joint histology, as well as inflammatory and bone turnover markers were measured. **RESULTS:** RvD1 is not toxic and inhibits OC differentiation and activation. It decreases bone resorption, as assessed by the inhibition of TRAP and cathepsin K expression, hydroxyapatite matrix resorption, and bone loss. In addition, RvD1 reduces TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , PGE₂, and RANK and concurrently enhances IL-10 in OC. Moreover, in arthritic mice, RvD1 alleviates clinical score, paw inflammation, and bone and joint destructions. Besides, RvD1 reduces inflammatory mediators and markedly decreases serum markers of bone and cartilage turnover.

CONCLUSION: Our results provide additional evidence that RvD1 plays a key role in preventing bone resorption and other pathophysiological changes associated with arthritis. The study highlights the clinical relevance of RvD1 as a potential compound for the treatment of inflammatory arthritis and related bone disorders.

Keywords: Arthritis, inflammation, resolvin D1, joint, bone resorption, mice.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic immune-mediated inflammatory disease that features persistent inflammation leading to joint tissue destruction [1]. Afflicting up to 1% of the general population worldwide, women are three to five times more likely to develop RA than men [2, 3]. Highly debilitating, RA leads to impair joint function, in addition to severe pulmonary, renal and cardiovascular dysfunctions, thereby affecting patient's quality of life and significantly decreasing their life expectancy [3, 4]. Joint injuries are associated with excessive synovial inflammation and hyperplasia which promotes recruitment of inflammatory cells [5]. These activated cells will further induce excessive release of pro-inflammatory and catabolic mediators within the joint, thereby causing cartilage and bone breakdown [5-7].

Due to the central role of the immune system and inflammation in the pathogenesis of RA, current therapies mainly target inflammatory mediators such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL6) [8]. However, even if the currently available therapies such as disease-modifying anti-rheumatic drugs improve RA symptoms, they are effective in only half of the treated patients [9, 10]. Moreover, the severe side effects attributed to the long term and high dosage usage limit their use [8].

Most importantly, none of these agents repair or even control joint damage [10, 11]. This underlines the importance of finding alternative pathophysiological pathways that could identify a new target leading, in terms, to a more adequate management of RA.

Hence, 2015 international recommendations for RA treatment set a dozen goals, the main one being to improve patients' long-term quality of life, by reducing symptoms and preventing irreversible joint damage. They have pointed out not only controlling, but eliminating inflammation as the most effective way to achieve it [12]. Promoting the resolution of inflammation could be one effective way to reach this goal. Indeed, the identification of the resolution phase of inflammation as an active process, once believed to be passive, has highlighted the fact that there is a fine line between sufficiently strong inflammation and uncontrolled chronic inflammatory responses seen in inflammatory diseases such as RA. Failure in the resolution responses may therefore be responsible for that line being overpassed [13, 14].

The resolution process is orchestrated by a number of mediators such as resolvins [15]. They are derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, with well-described anti-inflammatory and proresolutive activities [16, 17]. By counter-regulating pro-inflammatory mediators and decreasing neutrophil recruitment in inflammatory sites, these mediators actively trigger the resolution of inflammation and promote the return to homeostasis [18, 19]. Resolvin D1 (RvD1), an important member of resolvins, is biosynthesized from the omega-3 docosahexaenoic acid (DHA; C22:6) via 15-lipoxygenase (15-LOX) and 5-LOX interactions in humans [20, 21]. RvD1 properties encompass a wide spectrum, ranging from potent anti-inflammatory and pro-resolutive actions, to analgesic properties in inflammatory pain [20-23]. Moreover, we previously reported that RvD1 level is higher in knee synovial fluid from patients with osteoarthritis [24]. We, furthermore, demonstrated the potency of RvD1 in controlling inflammatory and catabolic responses, in human osteoarthritic chondrocytes.

Aiming to extend our research on the potential of RvD1 effects in inflammatory osteo-articular conditions, the purpose of this study is to determine the effects of RvD1 on RA onset and progression in vivo using a mouse model that shares many features with human RA as well as the molecular mechanism involved, using in vitro model.

MATERIALS AND METHODS

Materials

RvD1, LDH ELISA kit, and PGE₂ EIA kit were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). AMEM, RPMI 1640 1X medium, FBS, and antibiotics were purchased from Wisent Bio Products (Montreal, QC, Canada). LPS (E. Coli 0111:84), RANKL, M-CSF, TRAP staining kit, and mouse anti- β -actin antibody were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). MTS assay kit was purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA). Primary antibodies against mouse-TRAP and cathepsin K, Von Kossa (calcium stain) kit, and rabbit polyclonal anti-Beclin-1 were obtained from Abcam Inc (Toronto, ON, Canada). Peroxidase IgG secondary antibody was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). TNF- α and IL-10 ELISA kits were purchased from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). Th17-6 plex cytokines assay kit was purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). CTX-II ELISA kit and anti-mouse FPR2 antibody were purchased from MyBiosource (San Diego, CA, USA). CTX-I EIA kit was purchased from Immunodiagnostic Systems Limited (Baldon, United Kingdom). Ficoll-Paque PLUS was obtained from GE Healthcare (Mississauga, ON, CA). Osteo Assay Stripwell plates were purchased from Corning Inc. (New York, NY, USA). Arthrogein-CIA Arthrogein Monoclonal Antibody was purchased from Chondrex (Redmond, WA, USA). FPR2 siRNA and scramble siRNA were purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA, USA).

Cell Culture

Murine macrophage RAW 264.7 (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured with AMEM/10% FBS and antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Primary human monocytes were isolated from whole blood obtained from healthy volunteers. Briefly, blood was centrifuged on a Ficoll-Paque density gradient, as described previously [25]. Isolated monocytes were then cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, and antibiotics. All donors provided written, informed consent for the use of their blood for research purposes. Experimental protocols were approved by the Research Ethics Board of the “Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal”.

Animals

Thirty 8-week-old female DBA/1J mice, weighing approximately 18-20 g, were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Animal handling and experimental procedures were conducted in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. The experimental protocol was adapted from previously reported methods [26] and approved by the Animal Research Ethics Committee of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal.

Viability Assay and LDH Release

RAW 264.7 cells were cultured as described above then seeded in a 96-well plate at 4×10^4 cells/well then treated with RvD1 (0-500 nM) with or without LPS (50 ng/ml) for 48 h. Cell viability and LDH release were assessed with commercial kits under the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 590 nm with EL800 universal micro-plate readers (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

TRAP Staining

RAW 264.7 cells were cultured as described previously, seeded in chambered cell culture slides at 8×10^4 cells/well, and transfected or not with 100 nM FPR2 siRNA or scramble siRNA. Osteoclast formation was induced by treatment of cells with LPS (50 ng/ml) \pm RvD1 (0-500 nM) for 72 h. TRAP staining performed as recommended by the manufacturer. Nuclei were counter stained with Gill's hematoxylin and TRAP positive multinucleated osteoclasts staining (≥ 3 nuclei) was counted in 10 randomly selected high-power fields using digital EVOS light microscopy (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) at 20X magnification.

Western Blot

RAW 264.7 cells were seeded in a 24-well plate at 2×10^5 cells/well then treated with RvD1 (0-500 nM) with or without LPS (50 ng/ml) for 72 h. $\sim 20 \mu\text{g}$ total proteins were loaded onto a 4-12% gradient SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The primary antibodies were: anti-

mouse TRAP, anti-mouse cathepsin K, anti-mouse beclin-1, anti-FPR2, and anti-mouse β -actin primary antibodies. Revelation of immunoreactive bands and semi-quantitative analysis were performed as described in our previous report [24]

TNF- α , IL-10, PGE₂, RANK quantification in cell culture supernatant

TNF- α , IL-10, and RANK levels were assessed in cell culture supernatants by ELISA and PGE₂ level was determined by EIA, according to the manufacturer instructions. All assays were performed in duplicate. The absorbance was quantified with the micro-ELISA Vmax photometer at 405 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Hydroxyapatite Resorption Assay Pit Formation Assay

Mononuclear cells were seeded in an Osteo Assay Stripwell plate at 5×10^5 cells/well and allowed to adhere (2 h at 37°C) in RPMI/10% FBS in a humidified atmosphere and 5% CO₂. The nonadherent cells were removed by vigorous washes with PBS and adherent cells (mainly monocytes/macrophages) were cultured in RPMI/10% FBS containing 10 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml sRANKL. They were concurrently treated with increasing concentrations of RvD1 (0-500 nM) over two weeks. The culture medium was renewed every 3 days.

The resorption area in each plate was analyzed by Von Kossa staining following the manufacturer's instruction, then visualized and measured in 10 randomly selected high-power fields using digital EVOS light microscopy at 20X magnification.

Bone Resorption *in Ex-Vivo* Model

Bone explants from normal mice knee joints were rinsed in PBS containing antibiotics and cultured in BGJb medium supplemented with 20% FBS and antibiotics. Samples were treated or not with 10 ng/ml of M-CSF and 50 ng/ml of RANKL for 28 days in the presence or absence of 500 ng/ml RvD1. Culture medium were renewed 2 times per week. Bone histomorphometry was performed as described in our previous report [27] by measuring bone surface (μm^2) and marrow cavity area (μm^2).

Collagen Antibody Induced Arthritis (CAIA)

Arthritis was induced using an arthritogenic cocktail of five monoclonal antibodies anti-type II collagen (mAb) combined to LPS as previously describe [26]. Briefly, on day 1, mice were immunized by an intra-peritoneal (i.p.) injection of 1.5 mg of mAb, followed on day 4, by an i.p. injection of 50 µg of LPS (E. Coli 0111:84). Mice were monitored daily for body weight and disease scoring, and then sacrificed on day 10. Animals were randomly separated into 6 groups: Group 1 non-immunized mice; Group 2: CAIA mice, Groups 3-5 CAIA mice received a daily i.p. injection of 100, 500, and 1000 ng RvD1 since day 1, respectively; Group 6 CAIA mice received a daily i.p. injection of 1000 ng RvD1 from day 4. Groups 1 and 2 were given a saline solution with 0.1% EtOH instead. On day 10, mice were anesthetized by isoflurane inhalation, and blood was collected by cardiac puncture and then euthanized. Serum samples were stored at -80°C and knees and ankles were conserved in formalin until analyzed.

Clinical Evaluation of Induced Arthritis

Arthritis onset and progression were monitored daily by recording hind paw thickness using a caliper, arthritic score, and body weight, by two independent observers blinded to treatment groups. The arthritic score was graded using a 4-point clinical index for each paw, based on macroscopic signs (0 = no evidence of inflammation; 1 = inflammation (swelling and/or redness) in one joint; 2 = inflammation in two joints; 3 = inflammation in more than two joints; and 4 = severe arthritis of the entire paw and joints) as described by Lee et al. [28], for a total score of 0-16 for all four paws.

Serum Inflammatory Mediator's Determination

TNF- α , IL-17, IL-1 β , IL-6, and IFN- γ were quantified in serum using a convenient bioplex kit assay, according to the manufacturer's instructions. The concentrations of cytokines were measured using Bio-PlexTM 200 System instrument (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and Bio-Plex manager 4.1 Software.

Bone and Cartilage Remodeling Assessment

CTX-I and CTX-II, were quantified in mice serum by an EIA and ELISA kit, respectively, under the manufacturer's instructions. The sensitivity of each kit is 4.5 and 10 pg/ml, respectively, and the absorbance was measured at 450 nm with EL800 universal micro-plate readers (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Histopathology Study

Histopathologic sections of the knees were prepared following a conventional histopathologic processing of fixation, decalcification and paraffin embedding, as we previously reported [29]. The joints sections were stained with Safranin-O to assess cartilage degradation. Cartilage destruction was evaluated by two blinded observers, as described in detail in [29] using a previously described scoring system [30]. Osteoclast recruitment and activation were revealed by TRAP staining, as described in "TRAP staining" section. Cell proliferation in synovial membrane was performed by hematoxylin and eosin staining.

Micro-CT (μ -CT) Analysis

After the sacrifice, the ankles from each mice group were fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h and placed in PBS for 3-dimension (3D) μ -CT analysis. Each sample was scanned using Skyscan 1176-High Resolution in vivo X-ray Microtomography (Bruker-MicroCT, Kartuizer Weg 3B, Kontich 2550, Belgium) at 50 kVp and 500 μ A [26]. The 3D reconstruction was carried out using NRecon software, and the images were then after processed with μ -CT analyzer software.

Statistics

All experiments were at least triplicated. Means comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) with appropriate post-hoc analysis or 2-way ANOVA with repeated measures where appropriate. Data are expressed as mean \pm S.E.M. p-values <0.05 were regarded as significant.

RESULTS

RvD1 does not affect murine RAW 264.7 macrophages viability.

We first evaluated the potential toxicity of RvD1 in murine RAW 264.7 macrophages by performing an MTS assay. In contrast to H₂O₂, RvD1 did not alter the cell viability and LDH release after 48 h of incubation at tested doses ranging from 0 to 500 nM (Figs. 1A and 1B). Finally, the expression of Beclin-1, which is regulated in autophagy programmed cell death [31], was also unaffected by RvD1, in the presence or absence of LPS (Fig. 1C). Together, these data suggest that RvD1 does not affect cell viability.

RvD1 attenuates osteoclast differentiation and inflammatory mediator expression in RAW264.7 macrophages.

Here, we evaluated the impact of RvD1 treatment on RAW 264.7 macrophages-LPS-derived osteoclasts, by measuring their phenotypic markers, namely TRAP and cathepsin K. Western blot data show a strong inhibition of LPS-induced TRAP and cathepsin K expression by RvD1 at different concentrations (Fig. 2A) as well as TRAP activity and osteoclast differentiation (3 to 4-fold of inhibition, $p < 0.05$, Fig. 2B). Interestingly, down regulation of FPR2 expression by a specific siRNA abrogated the inhibitory effect of RvD1 as compared to LPS and LPS + scrambled (Sc) control siRNA (Fig. 2B). Of note, cell viability of transfected RAW264.7 with FPR2 siRNA or Sc siRNA was not affected and reached ~90-95% in comparison to untransfected cells.

We next investigated the anti-inflammatory of RvD1 in RAW 264.7 macrophages-LPS-derived osteoclasts. When used alone, RvD1 does not affect PGE₂, TNF- α , IL-10 releases neither RANK expression (Figs. 2C-2F). In contrast, RvD1 significantly reduces LPS-induced PGE₂, TNF- α , and RANK expression in a dose-dependent manner. At 500 nM, RvD1 significantly decreased LPS-induced PGE₂, TNF- α , and RANK by 3 to 4-fold (Figs. 2C, 2D, and 2F $p < 0.001$). In contrast, IL-10 level is significantly enhanced in RvD1-treated cells during LPS-induced osteoclast differentiation (Fig. 2E, $p < 0.0001$). Together, these results suggest that RvD1 inhibits osteoclast differentiation and activation, therefore reducing their pro-inflammatory mediator releases.

RvD1 prevents bone erosion using primary human monocyte-derived osteoclasts.

Next, we studied the effects of RvD1 on resorptive activity of human monocyte-derived osteoclasts. As shown by Von Kossa staining, a significantly higher erosion surface is observed when cells were M-CSF/RANKL (R-M)-differentiated when compared to control, while RvD1 at 500 nM drastically reduces hydroxyapatite matrix erosion to almost background level ($p < 0.01$, Fig. 3A). RvD1 at 100 and 1000 nM inhibits bone resorption in a similar pattern (data not shown). Interestingly, FRP2 silencing by siRNA abolished the inhibitory action of RvD1 ($p < 0.05$).

Then after, additional experiments were conducted using whole mouse femoral bone cultured during 4-weeks. The addition of 500 nM RvD1 reverses bone resorption induced by the R-M treatments to almost baseline level, as observed by hematoxylin and eosin staining (Fig. 3B, $p < 0.05$). This observation is sustained by a reduction in marrow cavity area and an increase in bone surface. Collectively, these data clearly demonstrate the pro-resolutive and antiresorptive potential of RvD1 on osteoclasts differentiation *in vitro* and *in ex vivo*.

RvD1 improves RA clinical endpoints in arthritic mice.

As expected, CAIA mice develop arthritis on day 4 and exhibit maximum inflammation between days 7 and 10 which was reflected by an increased arthritic score and swelling of paws as well as concomitant weight loss (Figs. 4A-4C). All RvD1 treatment groups exhibit a reduced arthritic score when compared to CAIA group ($p < 0.05$, Fig. 4A). Moreover, RvD1 mice had a lesser hind paw thickness over the disease period and reached a maximum effect at the end of the experiment (30% compared to CAIA group, $p < 0.05$, Fig. 4B). Furthermore, CAIA mice exhibit a trend toward weight loss over the disease period as compared to normal mice, with significant (up to 16%) weight loss at the end of the experiment. RvD1 treatment at 500 ng protected the mice from weight loss and reaches a maximum effect at day 10 (30% less than CAIA mice, $p < 0.05$, Fig. 4C). However, no significant differences were found in the measured parameters when 1000 ng RvD1 were given at day 4. Altogether, these findings underscore the clinical therapeutic potential of RvD1 for arthritis management. They indicate that

RvD1 treatment clearly alleviates RA main clinical endpoints, suggesting that RvD1 effectively delays RA onset, progression, and severity in an arthritic mouse model.

RvD1 attenuates synovial proliferation and bone resorption in arthritic mice

This part of the experiment was designed to verify the ability of RvD1 to attenuate histological changes in bone and synovial membrane. As shown in Figure 4D, RvD1 slightly reduced cell proliferation in synovium and strongly inhibited osteoclasts recruitment and activation in arthritic mice. Taken together, these data confirm the *in vitro* findings and indicate the biological efficacy of RvD1 in suppressing bone and joint damage.

RvD1 prevents cartilage degradation in knee joints of arthritic mice.

As expected, knee sections from RA mice show signs of histopathologic changes, such as fibrillation with loss of chondrocytes and proteoglycans, as compared to control mice (CTL) (Fig. 5A). In contrast, daily RvD1 treatment (100 and 500 ng) of the arthritic mice significantly reduced cartilage destruction and prevented chondrocytes and proteoglycan loss, when compared to RA, suggesting that RvD1 preserves normal homeostasis of the knee joint. Similar findings were obtained in animals treated with 1000 nM RvD1 given at day 1 and 4 (data not shown). These results are coherent with the arthritic score and the thickness of the paw that were measured.

RvD1 inhibits bone destruction in RA mice

We next investigate the ability of RvD1 to prevent bone loss in our RA mice model using μ CT imaging. μ CT analyses of the ankles from control, RA mice, and RA mice treated with RvD1 were performed in order to obtain a detailed image of the eroded mineralized bone tissues. As illustrated in Figure 5B, the intraperitoneal injection of 500 ng of RvD1 results in a marked reduction of bone erosion across several tarsal bones, as compared to RA mice ankles. These results suggest that RvD1 treatment prevents bone erosion *in vivo* as our results *in vitro*.

RvD1 reduces serum markers of cartilage and bone damage.

In order to evaluate by which mechanism RvD1 prevented bone erosion, we investigated the effect of RvD1 administration on the expression of bone destruction markers in RA mice model. First, our data indicated that RvD1 level increased in serum from RA mice and its administration at different doses enhanced its serum biodisponibility (Fig. 5C). Second, our findings revealed that RvD1 significantly reduced serum cartilage degradation markers, such as CTX-II (Fig. 5D), and serum bone resorption markers, such as CTX-I and TRAP (Figs. 5E and 5F), as compared to RA mice. Together, these findings suggest the protective effect of RvD1 against cartilage and bone destruction in RA disease and possibly in other bone and joint-related disorders.

RvD1 attenuates inflammatory mediators in arthritic mice serum.

This part of our study was designed to investigate the anti-inflammatory effect of RvD1 in the CAIA mouse model. As shown in Figure 6, RvD1 significantly down regulates the production of the most important inflammatory mediators playing crucial roles in RA. In fact, RvD1 given at 100 ng at day 1 and 4 significantly inhibits serum levels of inflammatory cytokines such as TNF- α (Fig. 6A, $p < 0.01$), IL-17 (Fig. 6B, $p < 0.001$), IL-1 β (Fig. 6C, $p < 0.01$), IL-6 (Fig. 6D, $p < 0.01$), IFN- γ (Fig. 6E, $p < 0.01$), and PGE₂ (Fig. 6F, $p < 0.01$) by nearly 50% compared to CAIA group. Altogether, these findings confirm our expectations that RvD1 exerts an anti-inflammatory action in arthritic mice.

DISCUSSION

As a chronic autoimmune inflammatory condition, RA has been extensively studied. The well-defined and consistent impairment in all RA patients is the severe joint dysfunction, associated with synovial inflammation, cartilage degradation, as well as osteoporosis [32]. At present, even if some treatments have improved RA therapy, they are still erratic and can cause notable side effects to the patient [33]. Finding a novel therapy could potentially enhance patient quality of life.

In this perspective, we studied an alternative approach for RA therapy using RvD1. RvD1 is an important factor in the resolution phase of inflammation, with well-known pro-resolving and anti-inflammatory properties. We have demonstrated that RvD1 is higher in inflammatory conditions [24], probably in an attempt to reduce the inflammation as an endogenous mechanism. Herein, we describe promising results about the contribution of RvD1 in improving RA symptoms and support the notion that RvD1 prevents arthritic joint disorders, caused by excessive cartilage degradation and bone resorption.

We initially studied the effects of RvD1 on macrophages and osteoclasts, which are key players in promoting and expanding inflammation in RA joint tissues. Macrophages play a pivotal role in promoting and maintaining RA pathogenesis. In concert with chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes, they drive cartilage catabolism through the release of catabolic and inflammatory factors. Here, we demonstrated *in vitro* that RvD1 significantly inhibited osteoclast differentiation and activation as well as the release of pro-inflammatory mediators. In contrast, IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was up-regulated. Besides, the osteoclasts inhibition by RvD1 treatment was associated with TRAP and cathepsin-K inhibition. Cathepsin-K actions are crucial in normal skeletal physiology [6] and have been implicated in bone and cartilage pathological degradation [34]. In fact, overexpressing cathepsin-K in mouse has led to synovitis, as well as cartilage and bone destruction, similar to the manifestation of RA [35]. Otherwise, it has been established that RA serum and synovial fluid present high levels of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α , as well as cathepsin-K, which triggers osteoclast differentiation and activation in the early phases of the disease [36]. Consistent with our findings, results have indicated that RvD1 reduces osteoclastogenesis through inhibition of the dendritic cell-specific transmembrane protein expression which is essential for cell fusion during osteoclastogenesis [37].

Likewise, DHA showed significant inhibitor effects on osteoclastogenesis, which was reversed by LOX inhibition, suggesting that DHA properties are essentially mediated by RvD1 [37, 38]. Similarly, Boeyens et al. indicated that RANKL-induced and DHA-treated RAW264.7 cells showed suppressed expression of cathepsin-K and TRAP [39]. Moreover, Gu et al. showed that RvD1, in addition to other resolution mediators is a strong inhibitor of pro-inflammatory cytokines produced by monocytes in response to stimulation with LPS [40], while Hsiao et al. suggested that RvD1 increased IL-10 levels in smoke-exposed mice lungs [41].

In the present study, we also put special emphasis on the potential of RvD1 to prevent bone erosion. Our results demonstrated that RvD1 strongly inhibited hydroxyapatite matrix degradation induced by RANKL + M-CSF using human primary monocytes. Indeed, many authors have reported that TRAP and cathepsin K-positive osteoclasts are largely found in areas of pannus invasion into bone in RA [5, 42, 43]. Bone damage arises from complex interactions involving osteoclast maturation, mainly mediated via RANKL, M-CSF, and TNF- α pathways [44]. It has been established that RvD1 and its aspirin-triggered epimer switch gene regulation profiles from M1-type pro-inflammatory macrophages into M2-type pro-resolution macrophages involved in homeostasis and bone repair [45, 46]. Hence, our findings contribute to the data dealing with the potential of RvD1 in bone protection.

Furthermore, in order to harness and clarify our findings, we focused on analyzing the involvement of FPR2/ALX receptors in RvD1 effects. Our results demonstrated that FPR2/ALX silencing inhibited RvD1 effects and led to significant osteoclasts differentiation as well as important hydroxyapatite matrix erosion, suggesting that RvD1 exerts its actions in part by interacting with FPR2/ALX receptors. These findings are consistent with the literature data indicating that RvD1 actions are mediated by two GPCRs, FPR2/ALX and GPR32 [47]. In fact, Krishnamoorthy et al. have shown that in self-limited peritonitis, RvD1 treatment reduced neutrophil infiltration in human FPR2/ALX-overexpressing transgenic mice, while this effect was not observed in FPR2/ALX knockout mice [48].

In an attempt to refine the *in vivo* effect of RvD1, another set of experiments was conducted using CAIA mouse model. Our findings showed that daily administration of

RvD1 provides its serum bioavailability that is consistent and predictable at every dose. As expected, the arthritic group displayed significant swelling and redness of paws as assessed by macroscopic clinical evaluation and also showed high levels of inflammatory mediators in mice serum. Whereas, daily treatment with RvD1 reduced paw swelling and redness and limited mice weight loss. More importantly, RvD1 strongly reduces TNF- α , IL-17, IL-6, IL-1 β , IFN γ as well as PGE₂, in mice serum. TNF- α , IL-17 and IL-6 have been shown to be closely correlated with RA activity [36], and IL-1 β involved in cartilage degradation [44].

In accordance with these effects, RvD1 reduced synovial proliferation, osteoclasts recruitment, and cartilage destruction in RA mice as depicted by the histological examination. Interestingly, the protective effect of RvD1 in cartilage and bone was confirmed by the decrease of serum levels of their respective biomarkers, namely CTX-II and CTX-I. Additional findings were obtained on bone resorption, as indicated by μ -CT analysis. Our findings support previous data on cartilage and bone metabolism. In chondrocytes, we demonstrated that RvD1 protects cartilage from degradation and preserves its homeostasis by inhibiting IL-1 β -induced matrix metalloproteinase-13 production in human chondrocytes [24].

Additionally, a significant amount of evidence revealed the presence of resolvins, in addition to FPR2/ALX in RA synovial tissues [10, 49, 50]. The interest for RvD1 in general, seems not only due to its potential to neutralize inflammatory and catabolic tissue insults, but also because of increasing data showing that it has the ability to repair injured tissues and most importantly to promote their regeneration. In the context of RA, Norling et al. [10] provided promising finding on RvD1 and its aspirin-triggered epimer. They identified its remarkable efficiency to relieve arthritis symptoms in the K/BxN mouse model. Furthermore, they identified the potential of RvD1 for chondroprotection since it promotes direct cartilage anabolic responses in vitro. Their findings are highly valuable and contribute to the advancement of knowledge on RvD1 and most importantly on how it could be beneficial for RA therapy. The ultimate objective being to build as complete knowledge as possible on a very promising therapy for inflammatory osteoarticular diseases, our study aimed to expand the knowledge by addressing other facets of RvD1 in other important hallmarks of RA. We showed that RvD1 preserves

joint structure and prevents bone destruction and erosion by inhibiting osteoclast recruitment.

CONCLUSION

In conclusion, the present study demonstrates that RA is indeed positively affected by RvD1 and contributes to other studies clarifying the implication of RvD1 in improving signs and symptoms of RA. This lends support to the notion that RvD1 acts as a potent resolution mediator to control arthritis inflammatory manifestations and may hold promise for use as a potent agent in RA therapy.

Ethics approval and consent to participate

The local ethics committee of “ Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal ” and The Research Centre of the “ Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal ” approved the study in human and in animal, respectively. Informed consent was obtained from all participants

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author, after permission of the research centre of the hospital du sacré-Coeur de Montreal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests and approved the final version of the manuscript

Funding

This work was supported by the “Fonds de recherche en orthopédie, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal” (grant to Dr Mohamed Benderdour, and by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP-130293 (to Dr. Hassan Fahmi).

Authors' contributions

HAB performed the experimental study, contributed to preparation of the manuscript and undertook the statistical analysis. MK & PER assisted in the experiments and in the cell culture and treatment. QS, HF, FV and JCF evaluated and interpreted the data and assisted with preparation of the manuscript. MB designed the study, supervised the project, evaluated and interpreted the data, and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Miss Courtney Stapleton for English language editing. We thank Miss Irene Londono for her technical assistance for μ -CT analyses.

Abbreviation

CTX-I = C-terminal telopeptide type II collagen; CTX-II = C-terminal telopeptide type II collagen; IL = Interleukin; IFN- γ = Interferon-gamma; LDH = Lactate Dehydrogenase; Lipopolysaccharide (LPS); M-CSF = Macrophage Colony-Stimulating Factor; NF- κ B = Nuclear Factor-kappa B; PGE₂ = Prostaglandin E2; RANKL= Receptor Activator of NF- κ B ligand; RvD1= Resolvin D1; RA : Rheumatoid Arthritis; TNF- α = Tumour Necrosis Factor alpha; TRAP = Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

REFERENCES

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2010; 376:1094-1108.
2. Fattahi MJ, Mirshafiey A. Prostaglandins and rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:239310.
3. Teng Y, Yin Z, Li J, Li K, Li X, Zhang Y. Adenovirus-mediated delivery of Sema3A alleviates rheumatoid arthritis in a serum-transfer induced mouse model. *Oncotarget*. 2017;8:66270.
4. Kiadaliri AA, Felson DT, Neogi T, Englund M. Brief Report: Rheumatoid Arthritis as the Underlying Cause of Death in Thirty-One Countries, 1987–2011: Trend Analysis of World Health Organization Mortality Database. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69:1560-1565.
5. Dharmapatni AA, Cantley MD, Marino V, Perilli E, Crotti TN, Smith MD, Haynes DR: The X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibitor embelin suppresses inflammation and bone erosion in collagen antibody induced arthritis mice. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:564042.
6. Sun P, Liu Y, Deng X, Yu C, Dai N, Yuan X, et al. An inhibitor of cathepsin K, icariin suppresses cartilage and bone degradation in mice of collagen-induced arthritis. *Phytomedicine*. 2013;20:975-979.
7. Liu Y, Lv J, Yang B, Liu F, Tian Z, Cai Y, et al. Lycium barbarum polysaccharide attenuates type II collagen-induced arthritis in mice. *Int J Biol Macromol*. 2015;78:318-23.
8. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:492-509.
9. Feldmann M, Maini RN. Perspectives from masters in rheumatology and autoimmunity: can we get closer to a cure for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:2283-2291.

10. Norling LV, Headland SE, Dalli J, Arnardottir HH, Haworth O, Jones HR, et al. Pro-Resolving and Cartilage-Protective Actions of Resolvin D1 in Inflammatory Arthritis. *JCI Insight*. 2016;1:e85922.
11. Klarenbeek NB, Güler-Yüksel M, van der Kooij SM, Han KH, Roday HK, Kerstens PJSM, et al. The impact of four dynamic, goal-steered treatment strategies on the 5-year outcomes of rheumatoid arthritis patients in the BeSt study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1039-46.
12. Woodworth TG, den Broeder AA. Treating to target in established rheumatoid arthritis: Challenges and opportunities in an era of novel targeted therapies and biosimilars. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2015;29:543-9.
13. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 2014;40:315-327.
14. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol*. 2010;177:1576-1591.
15. Perretti M, Cooper D, Dalli J, Norling LV. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 13:87-99.
16. Xu MX, Tan BC, Zhou W, Wei T, Lai WH, Tan JW, et al. Resolvin D1, an endogenous lipid mediator for inactivation of inflammation-related signaling pathways in microglial cells, prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19:235-43.
17. Corminboeuf O, Leroy X. FPR2/ALXR agonists and the resolution of inflammation. *J Med Chem*. 2014; 58:537-559.
18. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 2013;339:166-172.
19. Luo B, Han F, Xu K, Wang J, Liu Z, Shen Z, et al. Resolvin D1 programs inflammation resolution by increasing TGF- β expression induced by dying cell clearance in experimental autoimmune neuritis. *J Neurosci*. 2016;36:9590-9603.
20. Levy BD. Resolvins and protectins: natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010;82:327-332.
21. Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, Morán-Salvador E, Martínez-Clemente M, et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid

- promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol.* 2011;187:5408-5418.
22. Xu ZZ, Ji RR. Resolvins are potent analgesics for arthritic pain. *Br J Pharmacol.* 2011;164:274-277.
 23. Oehler B, Mohammadi M, Perpina Viciano C, Hackel D, Hoffmann C, Brack A, et al. Peripheral Interaction of Resolvin D1 and E1 with Opioid Receptor Antagonists for Antinociception in Inflammatory Pain in Rats. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:242.
 24. Benabdoune H, Rondon EP, Shi Q, Fernandes J, Ranger P, Fahmi H, et al. The role of resolvin D1 in the regulation of inflammatory and catabolic mediators in osteoarthritis. *Inflamm Res.* 2016;65:635-645.
 25. Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Mineau F, Jolicoeur FC, Benderdour M, et al. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis rheum.* 2000;43:1134-1144.
 26. Shi Q, Rondon-Cavanzo EP, Dalla Picola IP, Tiera MJ, Zhang X, Dai K, Benabdoune HA, Benderdour M, Fernandes JC. In vivo therapeutic efficacy of TNF α silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:387-402.
 27. Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, Fahmi H, Fernandes JC, Benderdour M. Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. *J Cell Biochem.* 2011;112:107-117.
 28. Lee J, Hong EC, Jeong H, Hwang JW, Kim H, Bae EK, et al. A novel histone deacetylase 6-selective inhibitor suppresses synovial inflammation and joint destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Int J Rheum Dis.* 2015;18:514-523.
 29. Abusarah J, Benabdoun HA, Shi Q, Lussier B, Martel-Pelletier J, Malo M, et al. Elucidating the Role of Protandim and 6-Gingerol in Protection Against Osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2017;118:1003-1013.

30. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14:13-29.
31. Messer JS. The cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:1281-1296.
32. Hawtree S, Muthana M, Wilson AG. The role of histone deacetylases in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Biochem Soc Trans*. 2013;41:783-8.
33. Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Nam JL, Smolen JS, Buch M, Gossec L, et al. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:529-35.
34. Salminen-Mankonen H, Morko J, Vuorio E. Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. *Curr Drug Targets*. 2007;8:315-23.
35. Morko J, Kiviranta R, Joronen K, Saamanen AM, Vuorio E, Salminen-Mankonen H. Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3713-7.
36. Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2007;7:65-70.
37. Yuan J, Akiyama M, Nakahama Ki, Sato T, Uematsu H, Morita I. The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2010;92:85-90.
38. Kasonga AE, Deepak V, Kruger MC, Coetzee M. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid suppress osteoclast formation and activity in human CD14⁺ monocytes, in vitro. *PloS one*. 2015; 10:e0125145.
39. Boeyens JC, Deepak V, Chua WH, Kruger MC, Joubert AM, Coetzee M. Effects of ω 3-and ω 6-polyunsaturated fatty acids on RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264. 7 cells: a comparative in vitro study. *Nutrients*. 2014; 6:2584-2601.

40. Gu Z, Lamont GJ, Lamont RJ, Uriarte SM, Wang H, Scott DA. Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3 β anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes. *Innate immun.* 2016; 22:186-95.
41. Hsiao HM, Sapinoro RE, Thatcher TH, Croasdell A, Levy EP, Fulton RA, et al. A novel anti-inflammatory and pro-resolving role for resolvin D1 in acute cigarette smoke-induced lung inflammation. *PloS one.* 2013; 8:e58258.
42. Schett G. Autoimmunity as a trigger for structural bone damage in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2017;27:193-197.
43. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheumatol.* 2000;43:250-8.
44. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity.* 2017;46:183-196.
45. Kang JW, Lee SM. Resolvin D1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing M2 macrophage polarization and efferocytosis. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861:1025-1035.
46. Schmid M, Gemperle C, Rimann N, Hersberger M. Resolvin D1 polarizes primary human macrophages toward a proresolution phenotype through GPR32. *J Immunol.* 2016;196:3429-37.
47. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Fredman G, Serhan CN. Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. *Am J Pathol.* 2012;180:2018-27.
48. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:1660-5.
49. Gheorghe KR, Korotkova M, Catrina AI, Backman L, Af Klint E, Claesson HE, et al. Expression of 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase in rheumatoid arthritis synovium and effects of intraarticular glucocorticoids. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R83.

50. Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, et al. Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2007 ;34:2144-53.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. RvD1 does not impair RAW264.7 cells viability. RAW264.7 cells were incubated with different concentrations of RvD1 (0-500 nM) without or with 50 ng/ml LPS for 72 h. Cell viability percentages were obtained by 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide assay **(A)** and LDH release was measured in cell supernatants by a commercial kit **(B)**. Cell death and LDL release were induced by the addition of 0.5 mM H₂O₂. Beclin-1 protein expression was assessed in cell extracts by western blot **(C)**. ANOVA test was performed to compare each condition. Results are expressed as mean \pm SEM for n = 4. Data are means \pm SEM and One-way ANOVA was performed to compare the results. ##p<0.01 compared to untreated cells.

Figure 2. RvD1 inhibits osteoclast activation and recruitment as well as LPS-induced TRAP, cathepsin-k, PGE₂, TNF- α , and RANK expression, and concurrently enhances IL-10 release in LPS-activated RAW 264.7 macrophages. Macrophages were stimulated with LPS (50 ng/ml) with or without RvD1 treatment (0-500 nM) for 72h. Cell extracts were collected, and then TRAP and cathepsin-k protein expression was assessed by western blot **(A)**. The same treatment was conducted after incubation or not of cells with sc-siRNA or siRNA against FPR2 (50 nM) for 24 h. TRAP enzymatic staining was performed and TRAP positive cells were observed with an inverted microscope (x200). Arrows show osteoclasts with 3 nuclei or more **(B)**. Western blot was employed to confirm FPR2 silencing by siRNA **(B)**. In parallel, cell media was collected and then PGE₂ **(C)**, TNF- α **(D)**, IL-10 **(E)**, and RANK **(F)** expression was assessed by commercial kits. Data are means \pm SEM for n=3 and One-way ANOVA was performed to compare the results. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 compared to non-stimulated cells; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 compared to LPS-activated cells.

Figure 3. RvD1 inhibits hydroxyapatite matrix degradation as well as bone resorption induced by primary human monocytes-derived osteoclasts. **(A)** Human monocytes were incubated on a hydroxyapatite matrix. They were first treated without or

with sc-siRNA or siRNA FPR2 (50 nM) for 24 h and then stimulated over two weeks with RANKL (50 ng/ml) and M-CSF (10 ng/ml) with or without RvD1 treatment (500 nM). Culture medium was changed every 3 days. Von Kossa staining was performed then pit areas were observed under inverted microscope (x200) and measured using ImageJ software. **(B)** Normal mouse femoral bone explants were incubated with RANKL (50 ng/ml) and M-CSF (10 ng/ml) with or without RvD1 treatment (100 or 500 nM) over 28 days. Culture medium was changed every 3 days. Hematoxylin-Eosin staining was performed and resorption areas were observed and scored under inverted microscope (x200). Data are means \pm SEM for n=3 and One-way ANOVA was performed to compare the results. ###p<0.01 compared to untreated cells; *p<0.05 compared to M-CSF/RANKL-activated cells; @p<0.05 compared to RvD1--stimulated cells.

Figure 4. RvD1 treatment improves RA clinical endpoints as well as synovium and bone changes in arthritic mice. Arthritis was induced by ip injection of arthritogenic cocktail of five monoclonal antibodies anti-type II collagen (mAb) on day 1, followed by ip injection of 50 μ g LPS on day 4, as described in methods. Over the course of the experiment, and for each of the experimental groups (non-immunized control mice, CAIA mice immunized with type II collagen antibody and treated with vehicle, and mice immunized with type II collagen and treated with RvD1 (100, 500, 1000 ng/day) at day 1 or with 1000 ng/ml at day 4, clinical score was attributed by two investigators blinded to groups on a scale of 0-4 for each paw, for a maximum of 16 for all four paws, as described in methods **(A)**. Hind paw thickness was measured using a caliper and expressed as thickness change from baseline **(B)**. Weight evolution was assessed and expressed as percentage of weight loss from baseline **(C)**. Data are means \pm SEM for n=6 and One-way ANOVA was performed to compare the results. *p<0.05, **p<0.01 compared to RA group. Cell proliferation in synovial membrane and TRAP staining in bone were performed as described in Material and Methods **(D)**.

Figure 5. RvD1 daily treatment prevents cartilage and bone alterations in arthritic mice joints. Arthritis was induced as previously described. After mice sacrifice, blood was collected. Knees and ankles were removed and then fixed and sectioned as described

in methods. Knee sections were stained with safranin-O staining and scored (A). Ankles were examined with a micro-CT scanner (B). Serum RvD1, TRAP, CTX-I, and CTX-II levels were assessed by EIA and ELISA, respectively (C-F). Data are means \pm SEM and One-way ANOVA was performed to compare the results. # p <0.05, ## p <0.01, #### p <0.0001 compared to non-immunized group; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to CAIA group. n = 4-5 mice per group. F = femur; T = tibia.

Figure 6. RvD1 daily treatment decreases inflammatory mediators release in arthritic mice serum. Arthritis was induced as previously described in figure 4. Blood was collected after mice sacrifice at day 10. Serum levels of inflammatory cytokines (A-E) as well as PGE₂ (F) were measured by multiplex and EIA assays respectively. Data are means \pm SEM. One-way ANOVA was performed to compare the results. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to CAIA group; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001, #### p <0.0001 compared to non-immunized group. n = 4-5 mice per group.

Figure 1

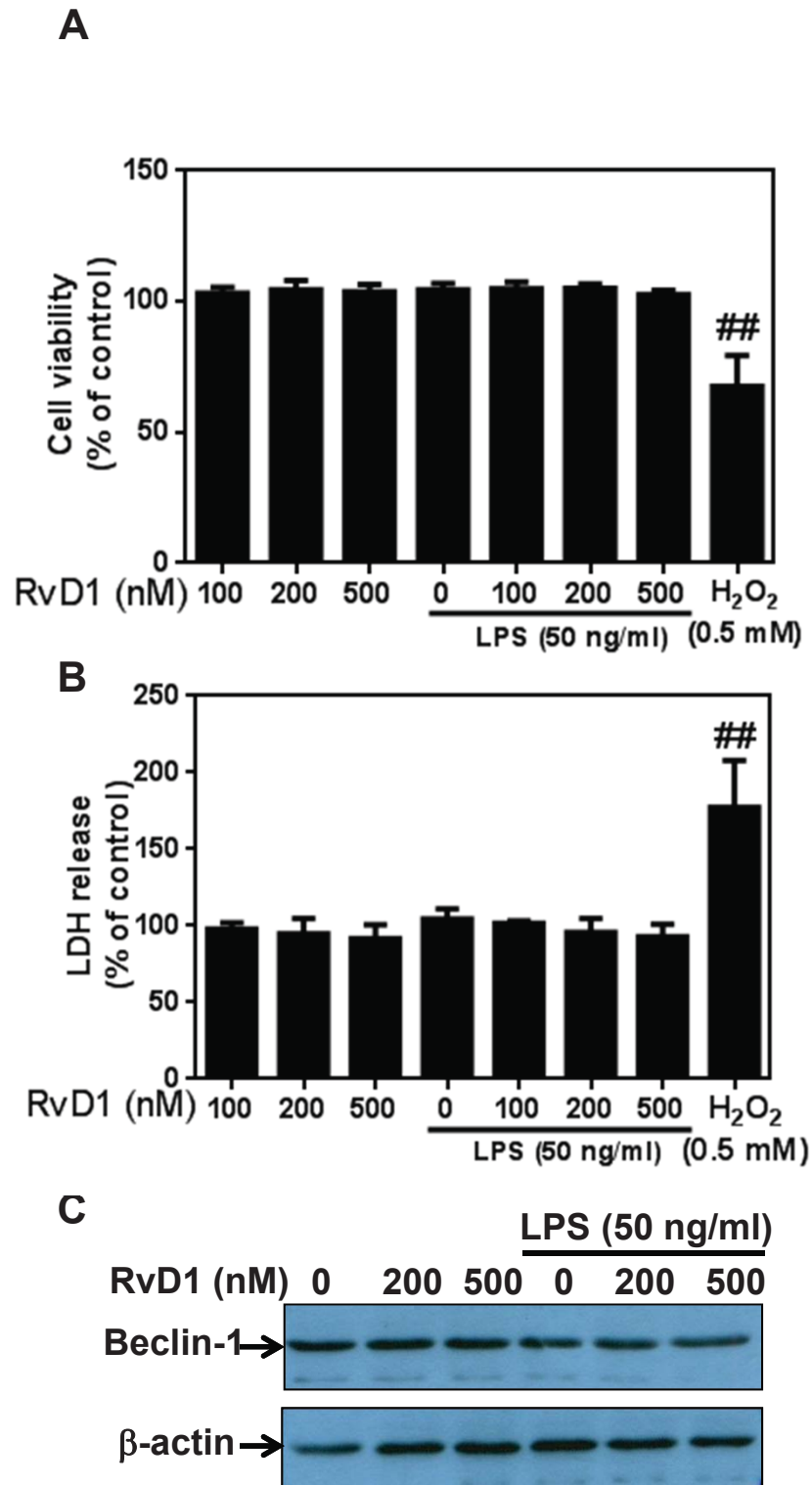


Figure 2

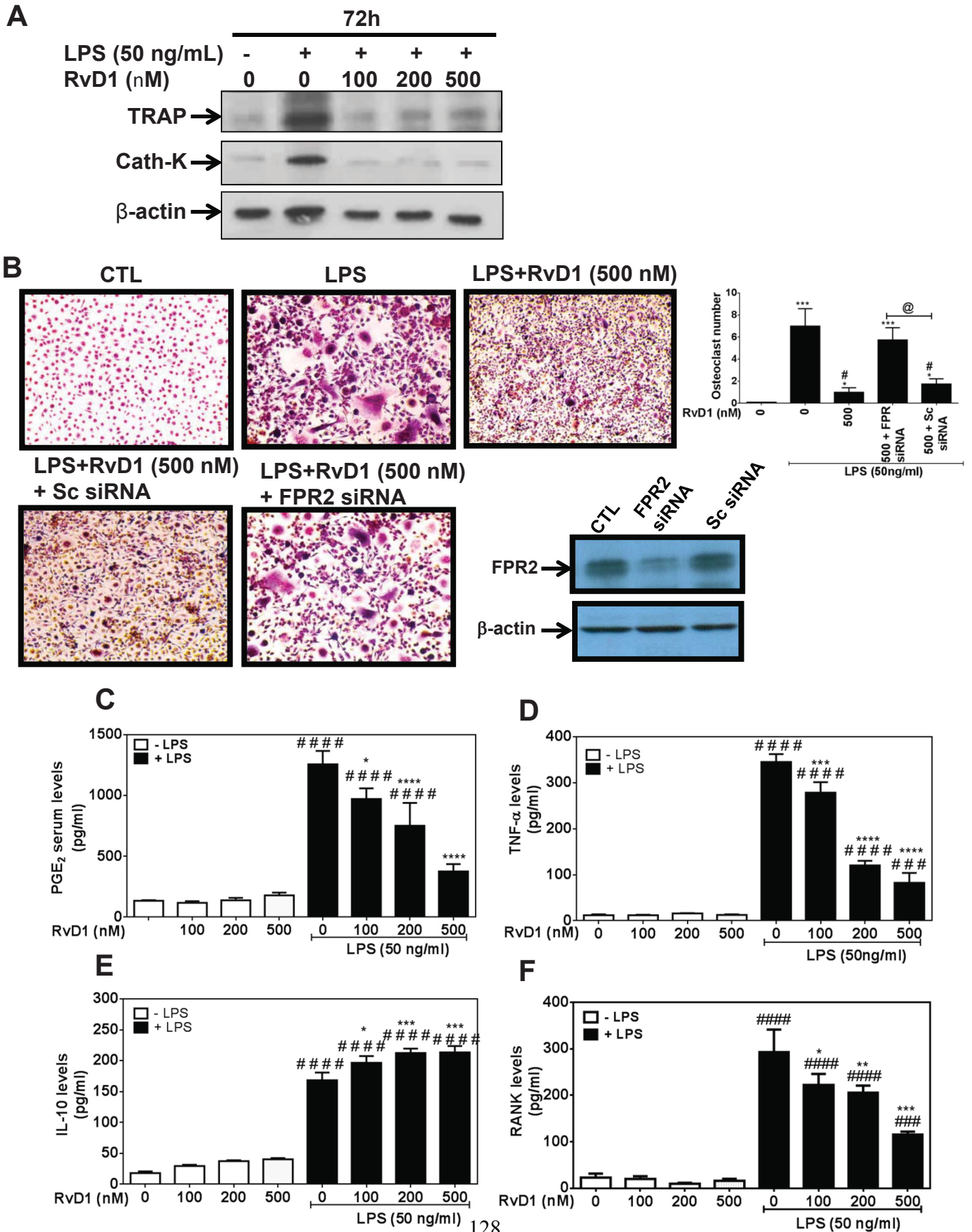


Figure 3

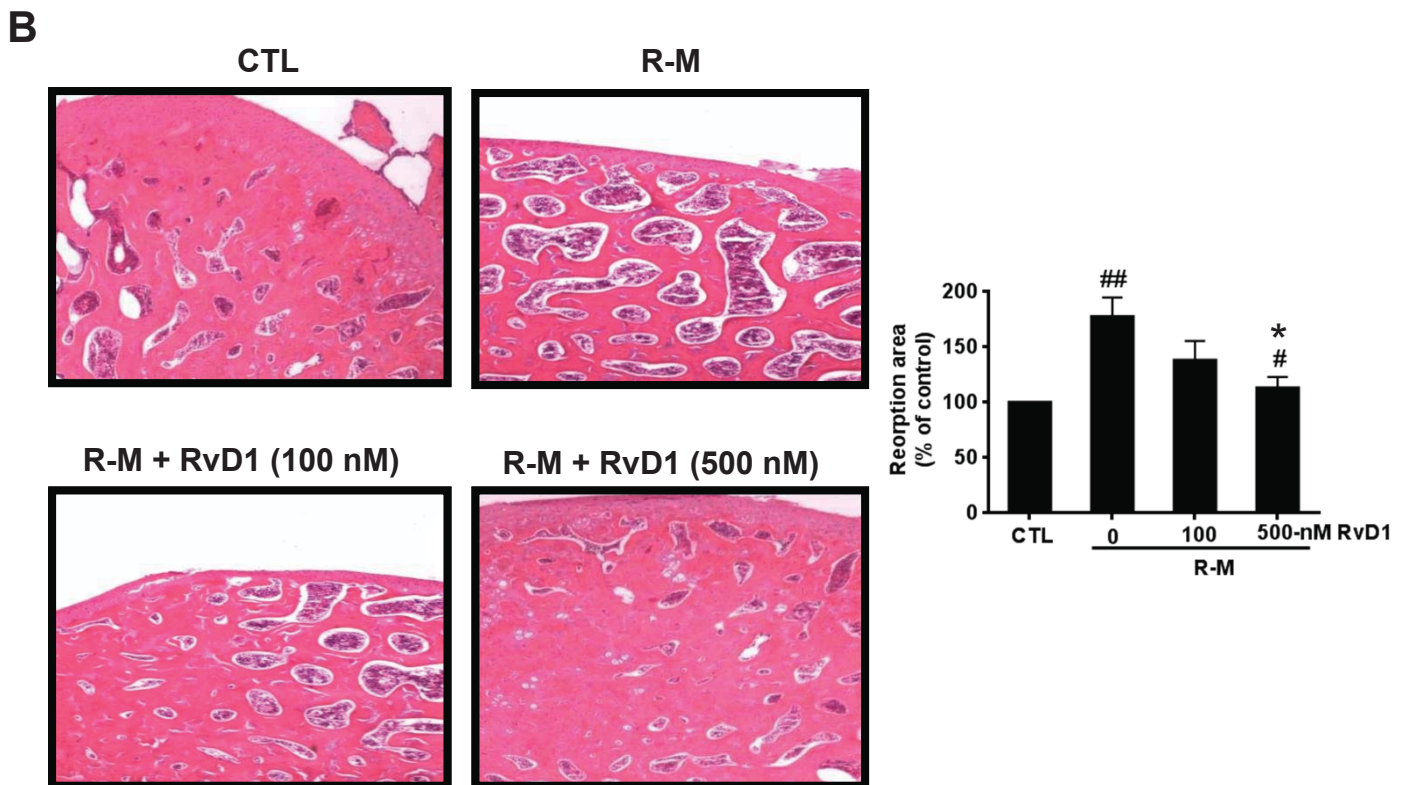
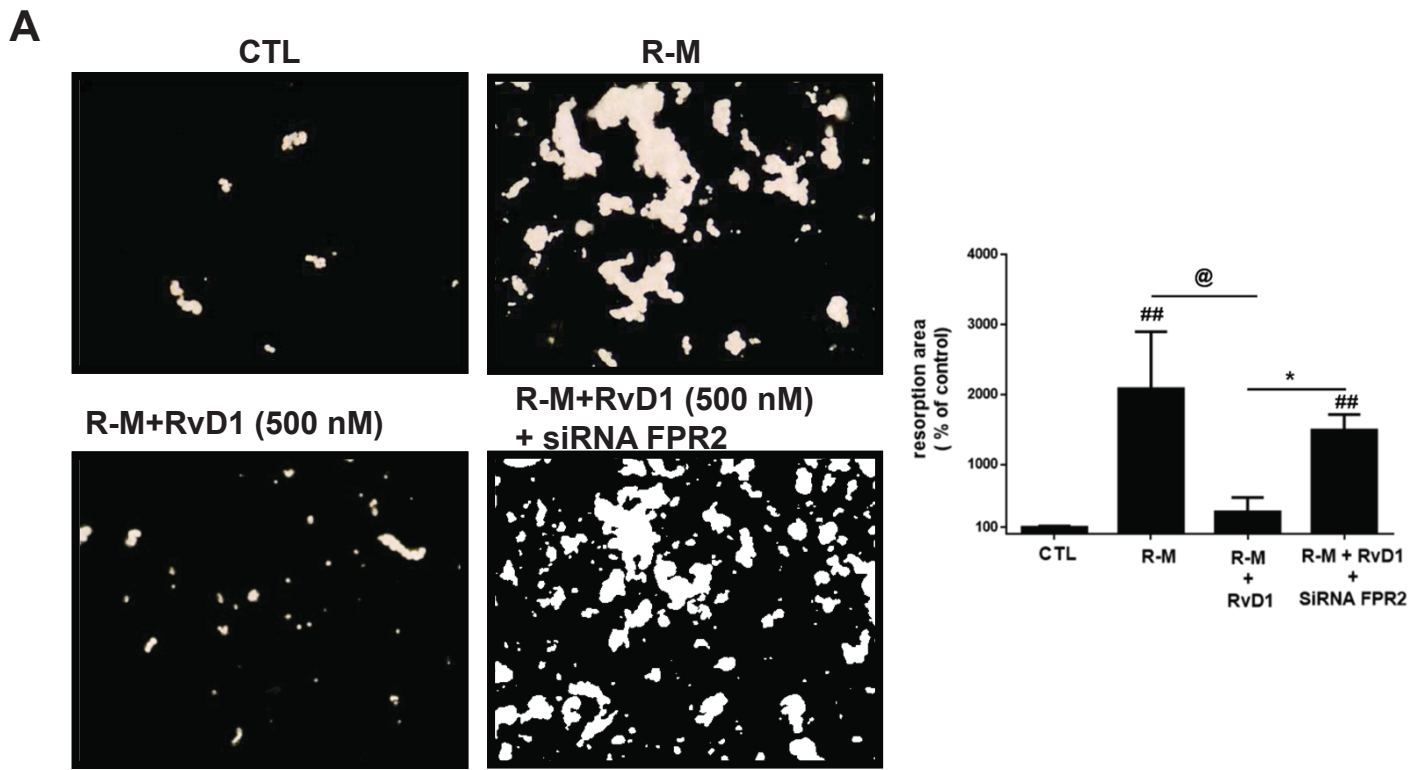


Figure 4

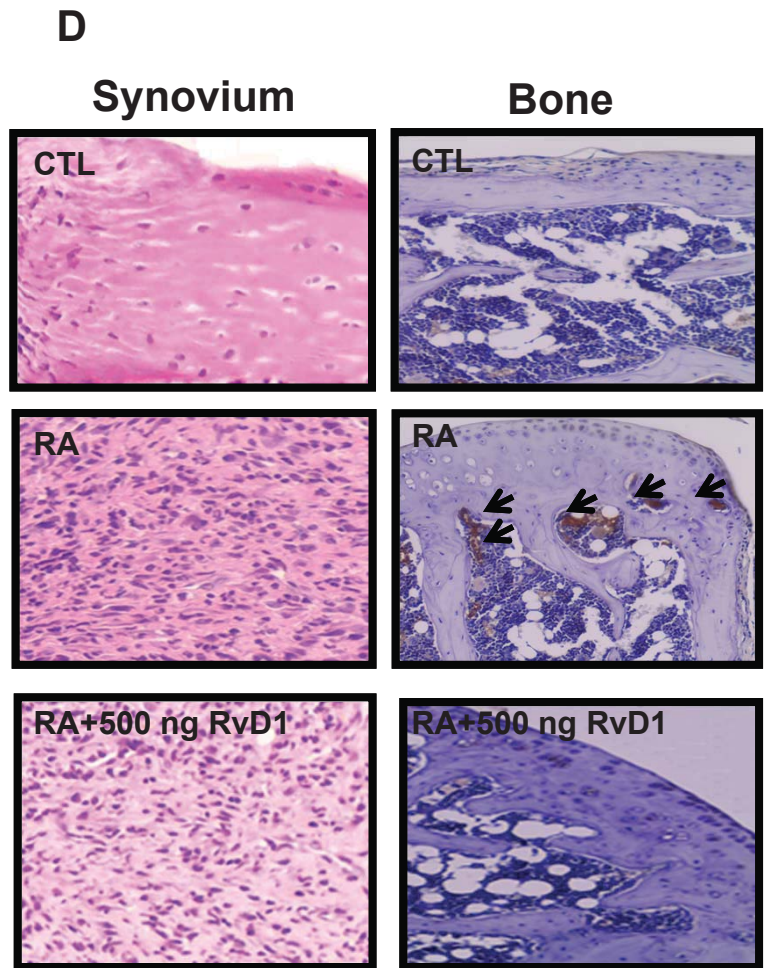
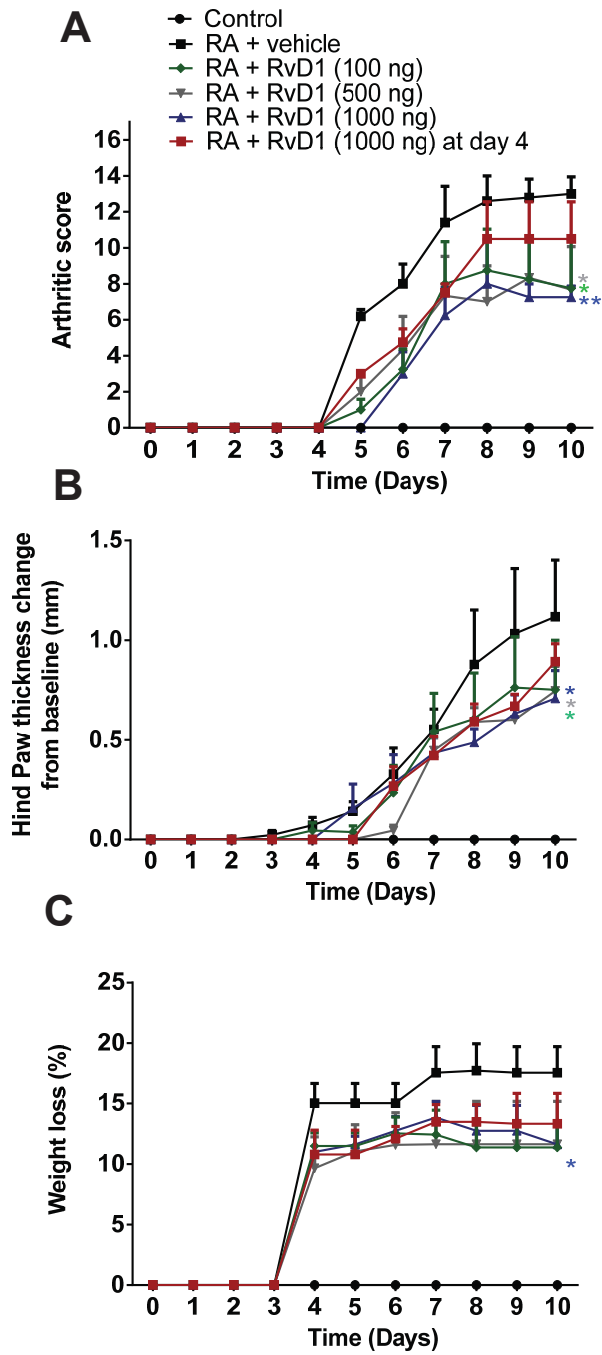


Figure 5

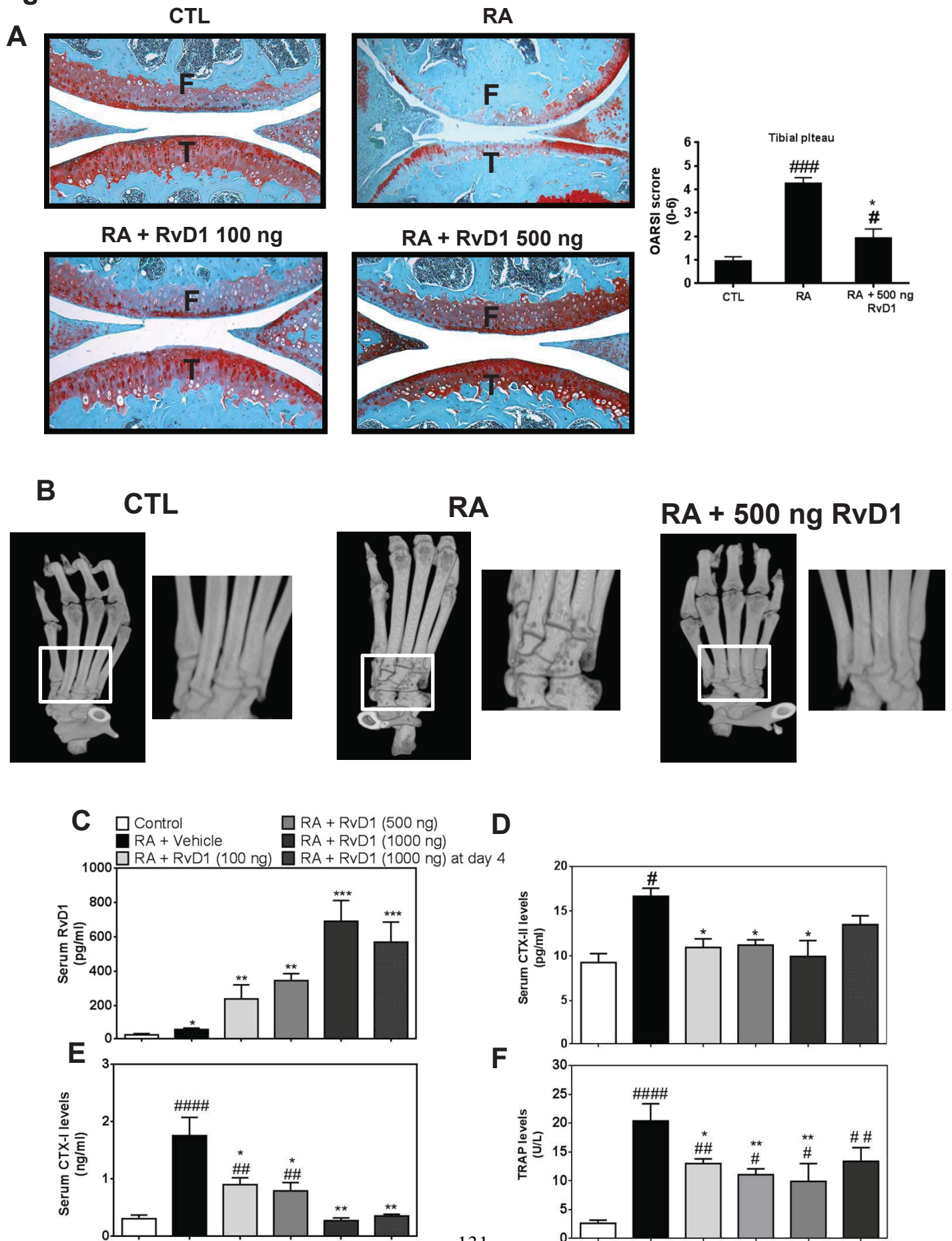
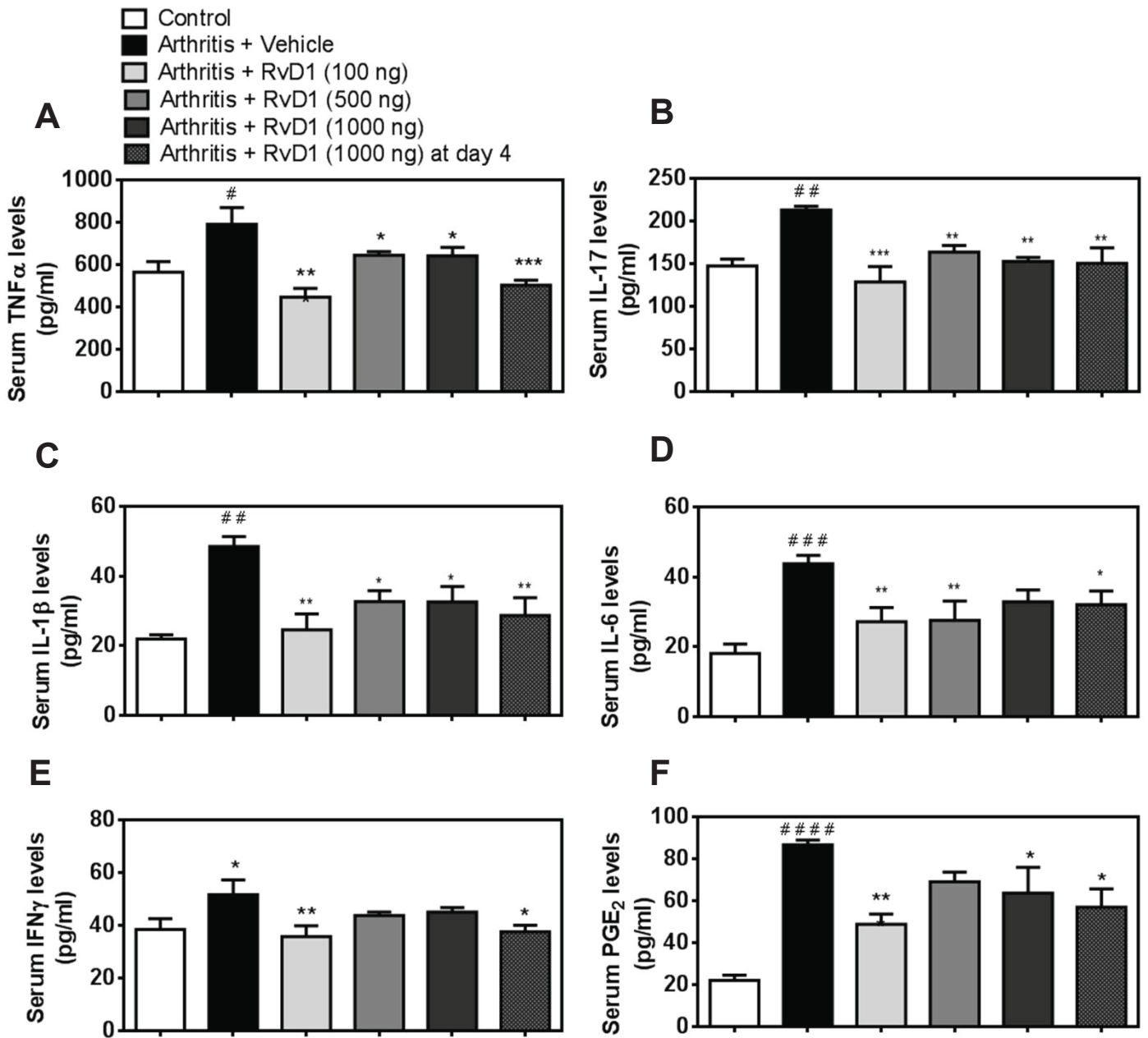


Figure 6



SECTION 3 : DISCUSSION

5 Discussion

L'implication de la résolution de l'inflammation dans diverses pathologies inflammatoires chroniques semble gagner de plus en plus d'importance depuis quelques années. On reconnaît aujourd'hui le rôle essentiel des résolvines et leur importance majeure pour atténuer le processus inflammatoire pathologique dans l'organisme. Parmi les résolvines, la RvD1 se distingue par de puissantes propriétés pro-résolutives et par son potentiel à réguler divers mécanismes impliqués dans l'inflammation. Des propriétés qui lui ont valu un intérêt considérable et ont fait que les projets de recherche se multiplient à son sujet, au cours de la dernière décennie. Sa large distribution dans les tissus biologiques témoigne du rôle essentiel qu'elle joue dans les différentes fonctions de l'organisme. L'os et l'articulation synoviale ne font vraisemblablement pas exception, même s'il n'existe que très peu de données traitant de ses effets à ce niveau. En effet, la majorité des travaux décrivent les actions de la RvD1 sur les cellules immunitaires notamment les macrophages et les neutrophiles, mais très peu d'études traitent de ses effets sur les composantes cellulaires de l'articulation à savoir les chondrocytes, les synoviocytes, les ostéoclastes ou les ostéoblastes. Particulièrement, le rôle de la RvD1 dans le métabolisme osseux *per se*, reste peu exploré et très peu de données existent sur ce sujet.

À cet effet et devant le manque de données dans la littérature face aux propriétés potentielles de la RvD1 dans le métabolisme osseux et articulaire, nous nous sommes proposés de clarifier son rôle sur le métabolisme ostéoarticulaire et de mettre la lumière sur son potentiel dans le maintien de l'intégrité articulaire. La première publication démontre que la RvD1 est bien produite dans l'environnement articulaire et s'oppose à l'inflammation, au catabolisme et au stress oxydatif au niveau du cartilage. Elle clarifie également ses effets sur les voies de signalisation intracellulaire médiées par l'IL-1 β , cytokine majeure impliquée dans la dégradation du cartilage. La deuxième publication vient préciser ces faits en démontrant, dans un premier temps, que la RvD1 s'oppose à la différenciation et l'activation des ostéoclastes et prévient la résorption osseuse *in vitro* et *ex vivo*. Par la suite, elle met en évidence l'ensemble des effets décrits de la RvD1 dans le contexte d'une maladie inflammatoire articulaire *in vivo*, la RA en l'occurrence, où elle réduit les signes cliniques, ainsi que les marqueurs biologiques de la dégradation osseuse et du cartilage caractérisant la maladie. Au niveau histologique, elle

protège le cartilage articulaire contre la dégradation, réduit le recrutement des ostéoclastes et atténue la prolifération cellulaire de la membrane synoviale.

L'ensemble de nos travaux expose les effets positifs de la RvD1 sur le métabolisme ostéoarticulaire et renforce sa pertinence clinique en tant qu'agent thérapeutique potentiel pour le traitement de l'arthrite inflammatoire et des troubles osseux associés.

5.1 La RvD1 est accumulée dans le liquide synovial et régule l'inflammation et le catabolisme des chondrocytes humains

Notre première observation démontre que la RvD1 est non seulement présente dans le liquide synovial articulaire mais surtout que ses niveaux sont plus élevés dans les conditions arthrosiques (modèle canin d'OA). Ces données concordent avec celles obtenues à partir de liquides synoviaux arthrosiques humains (résultats non publiés). Ces observations ne peuvent qu'affirmer l'implication de la RvD1 dans la physiopathologie articulaire. Plus important encore, ses niveaux élevés suggèrent fortement qu'elle est produite par les tissus articulaires telle une réponse endogène à l'état inflammatoire caractérisant l'articulation arthrosique. Nous avons expliqué dans les premiers chapitres que la résolution de l'inflammation coexiste avec les processus inflammatoires dans la tentative de les neutraliser par l'entremise des médiateurs de la résolution. Ceci s'applique sans doute à notre contexte, d'autant plus que les données de la littérature indiquent que les enzymes de la voie de biosynthèse de la RvD1 ; la 5- et 15-LOX, ainsi que son récepteur ALX/FPR2, sont également exprimés dans la synoviale. De façon intéressante, leurs taux sont plus élevés chez les patients RA comparés aux patients OA [150, 228], probablement en raison du statut inflammatoire plus prononcé dans la RA.

De ce résultat nous pouvons déduire que la production de la RvD1 est une réponse de l'organisme à l'environnement inflammatoire et catabolique prédominant au niveau des articulations arthrosiques, au même titre que l'est la surexpression marquée, néanmoins insuffisante, de certains autres médiateurs physiologiques. Citons à titre d'exemple, la synthèse des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-4 pour contrecarrer les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α [149], ou encore, la production des TIMP en réponse à l'expression accrue des MMP [229]. Or, dans ces mêmes articulations où la RvD1 a été détectée,

les phénomènes arthrosiques et les dommages tissulaires sont encore bien manifestes. Ceci nous renseigne que la RvD1 a un rôle probable dans les mécanismes de contrôle de l'inflammation et du catabolisme au niveau articulaire, mais que la mesure dans laquelle elle est produite reste insuffisante et présente le même profil d'inefficacité décrit pour les cytokines et les TIMP.

Ce premier résultat nous a alors menés à réfléchir sur l'intérêt d'une telle présence au niveau articulaire et nous interroger si la RvD1 serait une cible thérapeutique potentielle capable d'inhiber l'inflammation et le catabolisme ostéoarticulaire et, dans l'affirmative, dans quelle mesure et à quelle concentration un effet significatif serait observé.

L'étape suivante était donc d'étudier les effets de la RvD1 sur les médiateurs inflammatoires et cataboliques les plus impliqués dans les lésions articulaires en prenant comme premier modèle les chondrocytes arthrosiques humains.

Les résultats de la première publication démontrent que la RvD1 réduit de manière significative l'expression de l'ARNm et protéique de la COX-2 et de l'iNOS induite par l'IL-1 β , ainsi que leurs produits respectifs ; la PGE2 et le NO. Le rôle clé que jouent ces médiateurs dans le développement et la progression des lésion articulaires, notamment dans l'OA, a été largement étudié. Ils sont fondamentalement impliqués dans la perturbation des fonctions métaboliques des chondrocytes [161, 230]. La COX-2 et la PGE2 contribuent largement à l'inflammation et la dégradation du cartilage et jouent un rôle clé dans la progression et la douleur de l'OA [161, 231]. L'inhibition de la COX-2 par les AINS est d'ailleurs d'un intérêt certain dans la prise en charge thérapeutique de l'OA. De son côté, le NO, s'oppose à la synthèse de la matrice du cartilage, active les MMP et peut induire l'apoptose chez les chondrocytes, entre autres [232]. Ainsi, nos résultats suggèrent fortement que la RvD1 aurait un rôle protecteur vis-à-vis du cartilage, en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires.

La dégradation du cartilage est probablement la caractéristique la plus critique d'une articulation arthrosique. L'implication des MMP sécrétées par les chondrocytes dans la dégradation du collagène et des protéoglycanes du cartilage arthrosique est plus que bien établie. Les MMP sont souvent localisées dans les régions de dégradation du cartilage et leurs niveaux sont accrus dans le liquide synovial ainsi que dans le cartilage de patients souffrant d'OA. Fait intéressant, les niveaux de TIMP-1 sont également augmentés dans le liquide synovial

arthrosique et corrélient avec les niveaux des MMP [229]. Ceci reflète probablement une réponse adaptative endogène à l'activité accrue de ces protéinases dans l'OA. L'expression marquée de la MMP-13 dans le cartilage arthrosique et sa capacité plus prononcée et plus spécifique à dégrader le collagène de type II souligne le rôle majeur de cette enzyme dans la dégradation du cartilage [233].

Le résultat avancé par le présent travail démontre que la RvD1 réprime l'expression de la MMP-13 induite par l'IL-1 β . La valeur de ce résultat est considérable tenant compte du contexte inflammatoire et dégénératif qui marque l'OA. En effet, la capacité de réparation de la matrice cartilagineuse est très limitée et à moins que ce processus de dégradation ne soit interrompu, les dommages au cartilage risquent d'être irréversibles. Le caractère dégénératif irréversible du cartilage arthrosique souligne l'importance d'une telle trouvaille. Nos résultats concordent avec les données ultérieurement rapportées dans la littérature, décrivant les fonctions protectrices de l'AT-RvD1 au niveau du cartilage par action directe sur les chondrocytes. L'AT-RvD1 s'est non seulement opposée à la dégradation du cartilage induite par l'IL-1 β mais a de plus stimulé significativement des gènes impliqués dans la synthèse de la matrice cartilagineuse, à savoir le collagène de type II et les aggrecanes [93]. Par ailleurs, d'autres études ont démontré que le récepteur ALX/FPR2 est présent sur les chondrocytes humains et est positivement régulé dans les conditions cataboliques, telles que celles induites par l'IL-1 β [234].

Dans un deuxième temps, et dans la perspective de comprendre les actions de la RvD1 dévoilées par nos études, nous avons étudié son effet sur les voies de signalisation médiées par l'IL-1 β . Nos travaux montrent que la RvD1 s'oppose à l'activation des voies de signalisation JNK (*Jun N-terminal Kinase*) 1/2, p38 / MAPK et NF- κ B / p65, par l'IL-1 β . Cette dernière, via l'activation de ses voies de signalisation, contribue activement à l'exacerbation des processus arthrosiques, notamment à la dégradation du cartilage. D'ailleurs, la régulation de certains de ces kinases et facteurs de transcription s'est avérée extrêmement efficace dans le traitement des désordres inflammatoires, particulièrement dans la prévention des dommages articulaires, notamment la dégradation du cartilage. Par exemple, l'inhibition de la voie p38/MAPK atténue la dégradation du collagène induite par l'IL-1 β dans les chondrocytes en culture [235], et promeut une protection contre la destruction du cartilage dans un modèle d'arthrite induite par l'adjuvant chez le rat [236]. Ces résultats sont corroborés par les données de la littérature,

indiquant que chez les macrophages murins, la RvD1 inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B par le LPS et réduit par conséquent l'expression de TNF- α [237]. D'autres études montrent que la RvD1 atténue la dermatite psoriasiforme et améliore les modifications pathologiques de la peau via l'inhibition des voies p38 / MAPK, JNK 1/2 et NF- κ B / p65, induites par l'imiquimode [238].

L'inhibition de ces voies de signalisation ne fait qu'expliquer la modulation de l'expression des principaux acteurs de la dégradation du cartilage induits par l'IL-1 β . Toutefois, elle ne renseigne pas sur les voies directement induites par la RvD1. Par conséquent, bien que nos résultats aient identifié les mécanismes par lesquels la RvD1 s'oppose à l'action de l'IL-1 β au niveau des chondrocytes, ses actions directes demeurent inconnues. L'identification des voies intracellulaires exactes induites par la RvD1 permettrait d'accroître les connaissances sur ses mécanismes d'action au niveau des chondrocytes et ainsi de renforcer son intérêt dans le contexte de maladies ostéoarticulaires. Très peu de données dans la littérature identifient les voies de signalisation de la RvD1. Des études récentes ont démontré que dans les cellules des muscles lisses vasculaires, l'AT-RvD1 active la voie AMPc / PKA [239]. D'autres études ont montré, qu'elle active la voie de signalisation PI3K / AKT dans les cellules alvéolaires [240], et promeut l'activation de l'homodimère p50 / p50 dans les fibroblastes pulmonaires de rats [241]. De plus amples renseignements demeurent néanmoins nécessaires.

5.2 La RvD1 s'oppose au stress oxydatif et à l'apoptose des chondrocytes

Le maintien du phénotype ainsi que la survie des chondrocytes sont essentiels à la synthèse d'une matrice de cartilage normale. De plus en plus d'études suggèrent que l'apoptose des chondrocytes est un facteur majeur contribuant à la pathogenèse de l'OA [149, 242]. Les caspases-3 et -9 ainsi que de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 sont d'ailleurs au premier plan dans la régulation de ces processus apoptotiques [243]. À cet effet, nous avons évalué le potentiel de la RvD1 à prévenir les lésions du cartilage via l'inhibition de l'apoptose des chondrocytes. Nos résultats démontrent que la RvD1 inhibe l'activation des caspases-3 et -9 ainsi que la libération de LDH et s'oppose à l'inhibition de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2, induites par le HNE. Ce dernier est un produit réactif de la peroxydation

lipidique, connu pour induire l'apoptose des chondrocytes dans l'OA, en plus de participer au processus arthrosique *in vivo* [244, 245]. Ces résultats sont renforcés par l'étude subséquente des voies de transduction du signal apoptotique, qui révèle que la RvD1 s'oppose non seulement à l'inactivation de l'AKT induite par le HNE, mais active elle-même son expression. D'ailleurs, cela pourrait être une des voies de signalisation intracellulaire de la RvD1 dans les chondrocytes.

Considérant que l'apoptose des chondrocytes est un élément central dans la dégénérescence du cartilage, nos résultats montrent clairement, une fois de plus, que la RvD1 offre une réelle protection des chondrocytes et donc du cartilage articulaire.

Les données de littérature indiquent que la RvD1 réduit la mort cellulaire et s'oppose à l'inhibition de la prolifération et de la viabilité des cellules alvéolaires pulmonaires ainsi qu'à l'activation de la caspase-8, induites par sFasL et / ou TNF- α . Ces effets sont médiés par le récepteur ALX via l'activation de la voie PI3K / AKT [246]. D'autres auteurs rapportent que la RvD1 atténue l'apoptose des cellules épithéliales et endothéliales pulmonaires chez les souris prétraitées par le LPS [247]. En outre, dans les cellules de la conjonctive humaines et murines en culture, la RvD1 active AKT et ERK 1/2 et conduit à la stimulation de la sécrétion de mucine [248]. Enfin d'autres études indiquent qu'elle s'oppose à l'apoptose induite par le stress oxydatif en modulant la voie JNK 1/2 dans les cellules HepG2 [249] et en stimulant l'expression de Bcl-xL et Bcl-2 dans les macrophages [250].

D'un autre côté, le stress oxydatif est à l'origine de divers événements physiopathologiques impliqués dans la perturbation de l'homéostasie articulaire [251, 252]. En effet, il est prouvé que les ROS agissent en tant qu'intermédiaires de signalisation pour le TNF- α et l'IL-1 β [253, 254] et dégradent le cartilage par oxydation des composants de la MEC ou par modification post-traductionnelle des MMP [255, 256]. En outre, les produits finaux de la peroxydation lipidiques, notamment le HNE, induisent les principaux facteurs impliqués dans l'OA *in vitro* et *in vivo* [245]. Nos résultats montrent que la RvD1 régule le stress oxydatif et améliore le statut redox des chondrocytes arthrosiques via l'augmentation du pool du GSH. Ils concordent avec ceux de la littérature indiquant que la RvD1, administrée par voie intrapéritonéale à des doses de 3-100 ng / souris, réduit l'appauvrissement en GSH, la formation d'hydroperoxydes ainsi que la production d'anions superoxydes induits par l'irradiation de la peau avec des rayons ultraviolets. Elle induit également l'expression du facteur de transcription

Nrf2 (*nuclear factor erythroid-2-related factor 2*) impliqué dans la régulation des enzymes antioxydantes [257]. Dans une autre étude, la RvD1 induit la synthèse de GSH [121] et atténue l'apoptose induite par les ROS, via l'inhibition de la NADPH oxydase [250]. Ces résultats appuient une fois de plus, les effets bénéfiques de la RvD1 sur le cartilage articulaire.

L'ensemble de nos résultats démontre que dans les tissus articulaires, la RvD1 est bénéfique non seulement pour moduler l'inflammation, mais également pour s'opposer au catabolisme et à l'apoptose des chondrocytes et assurer de ce fait, une protection du cartilage. Cette découverte laisse suggérer que l'action de la RvD1 traduit une résolution de l'inflammation et plus important encore, un métabolisme articulaire axé sur l'inhibition de la dégradation du cartilage mais probablement aussi de la perte osseuse. L'étape suivante de nos recherches consistait à explorer les effets de la RvD1 sur le métabolisme osseux *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.

5.3 La RvD1 inhibe l'activation et le recrutement des ostéoclastes *in vitro* ainsi que la résorption de la matrice d'hydroxyapatite et des explants d'os *ex vivo*

Pour appuyer notre hypothèse stipulant que la RvD1 préserve l'intégrité articulaire, nous avons étudié ses effets sur les macrophages et ostéoclastes, pierre angulaire dans l'inflammation articulaire et l'érosion osseuse.

Une importante partie de la littérature portant sur les SPM, s'intéresse à leurs actions sur les macrophages. Elle rapporte essentiellement leurs effets sur la composante pro-inflammatoire, comme la libération des cytokines et des ROS ou alors sur la commutation phénotypique vers le phénotype de résolution [101, 258]. Néanmoins, à notre connaissance, très peu d'études traitent de leurs effets sur les macrophages en tant qu'acteurs du métabolisme articulaire. Notre travail s'est alors penché spécifiquement sur l'étude des effets de la RvD1 sur les macrophages au niveau articulaire *in vitro* et *ex vivo*. Nos résultats démontrent que la RvD1 inhibe la différenciation et l'activation des ostéoclastes à partir des macrophages, ainsi que la libération de médiateurs pro-inflammatoires notamment le TNF- α , la PGE2, mais également le RANKL, un facteur essentiel à la résorption osseuse. En revanche, elle stimule l'expression de

l'IL-10. Ces effets sur les ostéoclastes sont associés à l'inhibition de l'expression de TRAP et de la cathepsine K. Nous avons de plus, étudié ses capacités à protéger la matrice d'hydroxyapatite contre la résorption induite par des ostéoclastes dérivés des monocytes humains après activation par le RANKL et le M-CSF. Les résultats ont encore démontré que la RvD1 inhibe la résorption et prévient la dégradation de la matrice d'hydroxyapatite. Un dernier résultat mais non des moindre est obtenu de l'étude des effets de la RvD1 sur la résorption osseuse *ex vivo*, en utilisant des explants d'os fémoraux de souris, traités par le RANKL et le M-CSF. Sur ces explants, la RvD1 a démontré, une fois de plus, une inhibition spectaculaire de la dégradation la matrice osseuse fémorale induite par le RANKL et le M-CSF.

Dans les maladies inflammatoires et ostéoarticulaires telles que la RA ou l'OA, une multitude de médiateurs interagissent avec les cellules osseuses et inflammatoires et mènent entre autres à l'érosion osseuse et à l'ostéoporose sous-jacente caractérisant ces maladies. Parmi ces médiateurs, on peut nommer le système RANK / RANKL / OPG ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires notamment le TNF- α ou encore l'IL-6 [198]. Il a d'ailleurs été démontré que le sérum et le liquide synovial provenant des patients RA, présentaient des taux élevés d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-17 et de TNF- α , ainsi que de la cathepsine K [259, 260] et que le sérum des patients avec fractures de la hanche présente une expression marquée de l'IL-6 et de TNF- α [261].

D'un autre côté, la cathepsine K joue un rôle de premier plan, non seulement dans la physiologie osseuse [262], mais également dans la dégradation pathologique des os et du cartilage [263]. Sa surexpression chez la souris conduit à une synovite, ainsi qu'à une destruction du cartilage et des os [264]. Par ailleurs, de nombreux auteurs ont rapporté que dans la RA, les ostéoclastes exprimant TRAP et la cathepsine K sont largement présents dans les zones d'invasion de l'os par le pannus [265, 266].

Par ailleurs, un déséquilibre de l'expression de RANKL et de l'OPG mène à un déséquilibre métabolique en faveur du recrutement des ostéoclastes ainsi que l'augmentation de leur activité. Cliniquement, ceci se traduit par une érosion osseuse caractéristique, faisant que l'une des stratégies thérapeutiques pour la prévention de la dégradation osseuse notamment dans l'ostéoporose, s'appuie sur l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le RANKL [267].

Ainsi, les actions de la RvD1 que nous avons démontrées, semble clairement prévenir l'érosion osseuse *in vitro* et *ex vivo* et préserver de ce fait l'intégrité articulaire.

Certaines données de la littérature appuient notre raisonnement. Par exemple, Gu et al. [268] ont indiqué que la RvD1 ainsi que d'autres SPM, inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages en réponse à une stimulation par le LPS. De leur côté, Boeyens et al. [269] ont indiqué que les cellules RAW264.7 co-traitées par le RANKL et le DHA présentent une expression réduite de la cathepsine K et de TRAP. De même, d'autres études ont indiqué que le DHA a montré des effets inhibiteurs significatifs sur l'ostéoclastogénèse, qui ont été inversés par l'inhibition de la LOX, suggérant que les propriétés anti-résorptives du DHA sont essentiellement attribuées à la RvD1 [270, 271].

D'une autre manière, nos études soulignant les effets positifs de la RvD1 sur le métabolisme osseux sont également corroborées par les données d'une étude récente indiquant que la RvD1 s'oppose à l'activation de l'expression protéique et de l'ARNm du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6, induites par le LPS dans les ostéoblastes MG63 [272]. Enfin, une autre étude indique que la PTH stimule la production de la RvD1 et RvD2 qui activent à leur tour l'efférocytose des ostéoblastes apoptotiques par les macrophages, suggérant que ces SPM sont, en partie, à l'origine des effets bénéfiques de la PTH sur le métabolisme osseux [273].

5.4 Les effets de la RvD1 sont médiés par son récepteur

ALX/FPR2

Le récepteur ALX/FPR2 joue un rôle de pivot dans la régulation des réponses de l'hôte. Activé par ses ligands, notamment la LXA4 et la RvD1, il médie des effets pro-résolutifs et régule les processus immunitaires dans les tissus lésés [274-277]. De ce fait, comprendre le rôle de ce récepteur dans les effets de la RvD1 décrits ci-haut a vraisemblablement été au centre de nos démarches, afin de mieux mettre le doigt sur le mode d'action de la RvD1 et sur ses effets sur le métabolisme osseux. Nos résultats démontrent que le silançage de l'ARNm de FPR2/ALX supprime les effets de la RvD1 et rétablit la différenciation et le recrutement des ostéoclastes ainsi que l'érosion de la matrice d'hydroxyapatite induits par le M-CSF et le RANKL. Ceci suggère que les effets de la RvD1 décrits par notre étude, sont médiés en grande partie par son

récepteur ALX/FPR2. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature indiquant que les actions de RvD1 passent par deux GPCR, le FPR2/ALX et le GPR32. En effet, Krishnamoorthy et al. [102] ont montré que dans les cas de péritonite spontanément résolutive, le traitement par RvD1 réduisait l'infiltration de neutrophiles chez les souris transgéniques surexprimant le ALX/FPR2, alors que cet effet est nul chez les souris ALX/Fpr2^{-/-}. De plus, tel que mentionné plus haut dans cette section, l'AT-RvD1 stimule la synthèse de la matrice du cartilage par liaison directe au récepteur ALX/FPR2 sur les chondrocytes. Il médie ainsi les actions de la RvD1 sur les chondrocytes [93]. Ces résultats confortent l'idée selon laquelle l'expression de ce récepteur est modulée dans les conditions inflammatoires pour médier les actions de la RvD1 et promouvoir la résolution.

Toutes ces observations nous ont menés vers des études expérimentales *in vivo*, pour confirmer l'efficacité de la RvD1 comme traitement potentiel des pathologies articulaires.

5.5 La RvD1 inhibe l'inflammation et préserve l'intégrité des tissus articulaires *in vivo*

Notre deuxième publication fournit des preuves supplémentaires et très solides sur le rôle de la RvD1 dans la prévention des lésions articulaires et des modifications physiopathologiques qui y sont associées.

Puisqu'on avait déjà démontré des effets très prometteurs de la RvD1 sur les cellules du cartilage et de l'os, nous nous sommes demandé si ces effets pourraient se traduire *in vivo* par une résolution de l'inflammation et surtout par des actions protectrices sur les tissus osseux et articulaires. L'ensemble des effets de la RvD1 a alors été étudié sur un modèle murin d'une pathologie inflammatoire touchant principalement l'articulation et mettant en avant à la fois la dégradation du cartilage et l'atteinte osseuse secondaire, en plus de l'inflammation de la synoviale. La pathologie en question étant la RA, elle a été étudiée en utilisant le modèle CAIA chez la souris. Les résultats de cette étude montrent que l'administration quotidienne de la RvD1 chez les souris RA, réduit les signes cliniques de la maladie, notamment l'œdème et la rougeur des pattes. Plus important encore, la RvD1 réduit fortement l'expression des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-17, IL-6, IL-1 β et IFN- γ) ainsi que de la PGE2, dans le sérum de

souris. Tel que discuté dans le chapitre 4.3, ces cytokines sont largement impliquées dans la pathogenèse de la RA. Par des voies de signalisation complexes, elles agissent sur différentes cellules et amplifient l'inflammation, qui mènera entre autres, à la dégradation du cartilage ainsi qu'à une ostéoporose périarticulaire. Ces deux phénomènes seraient alors atténués à la suite de l'inhibition de l'expression des cytokines par la RvD1. Effectivement, les résultats des études histologiques révèlent que la RvD1 prévient la perte de chondrocytes et de protéoglycanes et s'oppose ainsi à la dégradation du cartilage. De plus, elle inhibe fortement le recrutement des ostéoclastes articulaires principalement incriminés dans l'érosion osseuse dans les articulations arthritiques. Enfin, elle atténue significativement la prolifération synoviale caractéristique de la RA. La RvD1 a ainsi procuré un effet protecteur sur le cartilage et les os articulaires, confirmé par la diminution des taux sériques de CTX-II, CTX-I, biomarqueurs de la dégradation du cartilage et de l'os respectivement. Ces derniers sont des prédicteurs puissants des érosions articulaires, tel qu'illustré par l'étude COBRA où des niveaux élevés de CTX-I et CTX-II mesurés au début de la RA prédisent un risque accru de lésions articulaires ultérieures [278].

L'aspect saillant de notre étude est l'effet protecteur de la RvD1 sur le métabolisme osseux. En effet, en plus des biomarqueurs cités ci-haut, ses effets sur l'intégrité osseuse ont été démontrés par analyse de micro-CT, qui révèle une réduction des zones de résorption osseuse au niveau des chevilles des souris traitées par la RvD1 par rapport aux souris RA. Ce résultat renseigne clairement sur les aptitudes de la RvD1 quant à la préservation de l'intégrité osseuse *in vivo*.

Un autre aspect important de l'étude est le fait d'avoir validé une marge de doses thérapeutiques de la RvD1 *in vivo*. Certaines recherches tendent à étudier les effets bénéfiques de la supplémentation en AG ω -3 sur les maladies ostéoarticulaires, sans vraiment réussir à démontrer un effet thérapeutique significatif [279], probablement parce que les concentrations de la RvD1 et des SPM en général provenant du métabolisme des AG ω -3, n'atteignent pas la marge thérapeutique efficace. Norling et al. [93] ont démontré que la supplémentation de souris RA en AG ω -3 donne des taux de RvD1 de 6.6 ± 1.4 pg / patte de souris. Bien que ces souris aient tout de même montré une amélioration des signes cliniques de la maladie, la dose de l'AT-RvD1 qui a réussi à procurer une protection articulaire significative était largement supérieure aux concentrations issues des AG ω -3, soit 100 ng/ souris. Ainsi, la posologie utilisée dans nos

études offrant des doses plus élevées en RvD1 que ce que la supplémentation en AG ω -3 peut fournir, explique, au moins en partie, les résultats non-concluants observés dans ces études et apporte des clarifications et une validation de la marge thérapeutique efficace et sécuritaire de la RvD1 *in vivo*.

Ces résultats sont d'une valeur considérable, car ils élargissent les connaissances sur les effets de la RvD1 dans les conditions inflammatoires et dégénératives au niveau articulaire et étudient des aspects pathologiques qui n'ont pas été préalablement abordés par d'autres recherches. En effet, Lima-Garcia, et al. [226] ont étudié l'aspect analgésique de l'AT-RvD1 dans un modèle d'arthrite induite par l'adjuvant chez le rat. De leur côté, Norling et al. [93] ont décrit l'action de l'AT-RvD1 sur le modèle murin K/BxN de la RA, où ils ont démontré ses effets positifs sur les signes cliniques de la maladie et sa capacité à raccourcir l'intervalle de la rémission. Cependant, dans leur recherche, ils se sont particulièrement penchés sur l'étude du profil métabololipidomique dans les articulations arthritiques où ils ont démontré que l'AT-RvD1 module le profil des médiateurs lipidiques, en réduisant la biosynthèse de la PGE2 tout en augmentant les niveaux des autres SPM. Ils ont également montré que l'AT-RvD1 réduit l'infiltration de leucocytes dans les articulations des souris et confère des actions protectrices vis-à-vis du cartilage. Enfin, très récemment, Sun A et al. [227] ont montré que l'administration intra-articulaire de RvD1 diminue la progression de l'OA chez les souris obèses, en diminuant l'infiltration des macrophages dans la synoviale et en prévenant la dégradation du cartilage.

Tout comme la nôtre, ces études se distinguent par un profil de recherche particulier et apportent chacune une contribution propre. Elles sont complémentaires et contribuent ensemble à l'avancement des connaissances sur les effets de la RvD1 dans les maladies articulaires.

Enfin, nos résultats discutés jusqu'ici ont une valeur clinique substantielle. Comme mentionné dans le chapitre précédant, la plupart des traitements actuellement utilisés pour l'OA ou la RA (à l'exception des traitements biologiques) ne procurent aucun effet protecteur significatif sur le métabolisme osseux. Même que certains traitements anti-inflammatoires comme les corticostéroïdes ont un effet délétère sur l'intégrité osseuse [280]. Les médicaments biologiques décrits au chapitre 4 sont indiqués quand il y a présence de résorption osseuse non contrôlée. Cependant, ils ont des effets secondaires immunosuppresseurs majeurs. Tous ces traitements corrigent, certes, dans une certaine mesure, les défaillances inflammatoires ou

immunitaires observées dans l'OA et la RA et ont de ce fait un effet thérapeutique incontestable mais certainement insuffisant pour assurer une protection tissulaire et combler le besoin thérapeutique de ces maladies. À l'instar de ces traitements, la RvD1 agit sur la composante inflammatoire et immunitaire et semble, de surcroît, combler ce vide thérapeutique d'une façon tout à fait complémentaire mais aussi plus sécuritaire. En effet, le point fort de cette approche étant qu'en plus de ses puissantes actions biologiques, la RvD1 serait théoriquement dépourvue des effets secondaires majeurs rencontrés avec les traitements anti-inflammatoires et immunosuppresseurs classiques. Cela serait attribué au fait que par son principe d'action endogène, elle mime les mécanismes naturels de l'organisme et ne s'oppose pas de façon intense aux actions des médiateurs inflammatoires. Au contraire, elle rééquilibre les mécanismes pro- et anti-inflammatoires et module les réponses immunitaires vers l'immunité adaptative [281]. De plus elle procure de puissants effets analgésiques. Plus important encore, l'intérêt pour la RvD1 découle de sa capacité à induire des réponses anaboliques et à réparer les tissus endommagés et surtout à promouvoir leur régénération, une condition préalable au retour de l'homéostasie [53].

5.6 Perspectives futures

5.6.1 Perspectives à court terme

Les résultats présentés par ce travail nous poussent à spéculer que la RvD1 a des effets très prometteurs dans la physiopathologie ostéoarticulaire et pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des maladies musculosquelettiques.

Jusqu'ici, très peu d'équipes se sont intéressées à développer les connaissances physiopathologiques portant sur le rôle de la RvD1 dans un contexte osseux, pas plus qu'à ses applications potentielles comme molécule thérapeutique dans les pathologies ostéoarticulaires.

Une meilleure compréhension des effets de la RvD1 sur le métabolisme articulaire s'impose. Il est alors important de définir ses cibles moléculaires sur les cellules et composantes articulaires, ainsi que ses circuits de signalisation cellulaire en amont des effets observés. En outre, il serait important d'élargir les connaissances sur ses actions sur les ostéoclastes et les chondrocytes et d'élucider ses effets sur les ostéoblastes pour enfin clarifier ces mécanismes sur le métabolisme osseux et les appliquer à des pathologies comme l'OA, la RA et l'ostéoporose secondaire voire même l'ostéoporose primaire.

5.6.2 Perspectives à long terme

Les résultats de ce travail laissent présager une application clinique potentielle de la RvD1 et jettent les bases du développement de stratégies thérapeutiques innovantes. Le développement d'analogues pharmacologiques plus puissants et plus stables, en améliorant la structure par l'addition de radicaux chimiques par exemple, ou encore l'utilisation de vecteurs pharmaceutiques, tels que des nanoparticules plus spécifiques des cibles visées, représenterait des approches très prometteuses qui ouvriraient la voie à une nouvelle génération de molécules thérapeutiques.

Cliniquement parlant, si on prend l'exemple de l'arthrite, un traitement basé sur la RvD1 pourrait se faire au tout début du traitement au même titre que le MTX, ou alors en association pour retarder ou même limiter le recours aux médicaments biologiques dans des cas d'arthrite rebelle au traitement classique.

Conclusion

En réponse aux hypothèses émises dans ce travail, nous pouvons conclure que :

Hypothèse 1 : « La RvD1 exercerait de puissants effets de résolution de l'inflammation sur les processus majeurs impliqués dans la physiopathologie articulaire »

La RvD1 s'oppose à l'inflammation et au catabolisme et inhibe l'activation des voies de signalisation de l'IL-1 β dans les chondrocytes arthrosiques humains. De plus, elle prévient l'apoptose cellulaire et le stress oxydatif induits par le HNE et active la voie de l'AKT. Nous mettons ainsi la lumière sur son intérêt probable dans la prise en charge thérapeutique des maladies ostéoarticulaires.

Hypothèse 2 « La RvD1 aurait un effet d'inhibition de la résorption osseuse ».

Nous avons démontré que la RvD1 inhibe de façon significative la différenciation et l'activation des ostéoclastes *in vitro*, la dégradation de la matrice d'hydroxyapatite et d'explants d'os de souris *ex vivo*, ainsi que la libération de médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans l'érosion osseuse et la destruction des tissus articulaires. Ceci souligne l'effet protecteur majeur de la RvD1 sur l'érosion osseuse.

Hypothèse 3 : « Les effets positifs de la RvD1 observés *in vitro* et *ex vivo* seraient reproduits *in vivo* dans un modèle murin de RA en limitant les lésions articulaires principalement la dégradation du cartilage et la résorption osseuse. »

Nous avons démontré *in vivo*, les effets bénéfiques du mécanisme endogène de résolution de l'inflammation procuré par la RvD1 chez le modèle murin CAIA. La RvD1 a réduit les signes cliniques de la maladie et a préservé les articulations de la destruction du cartilage et des os ainsi que de la prolifération de la synoviale.

En résumé, cet ouvrage a permis de faire avancer les connaissances quant au rôle de la RvD1 dans les processus physiopathologiques au niveau articulaire.

Considérant les connaissances existantes décrivant le rôle de la RvD1 dans une multitude de tissus biologiques en réponses à divers états pathologiques, en plus des données présentées dans cet ouvrage sur les fonctions importantes de la RvD1 dans le maintien de l'intégrité articulaire et la prévention de la dégradation osseuse, il ne fait aucun doute que la RvD1 occupe une place primordiale dans la prise en charge thérapeutique des maladies ostéoarticulaires.

Bibliographie

1. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ: **Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation.** *Annual Review of Ecology, Evolution, Systematics* 2012, **43**:385-406.
2. Okin D, Medzhitov R: **Evolution of inflammatory diseases.** *Curr Biol* 2012, **22**(17):R733-R740.
3. Lange C, Hemmrich G, Klostermeier UC, López-Quintero JA, Miller DJ, Rahn T, Weiss Y, Bosch TC, Rosenstiel P: **Defining the origins of the NOD-like receptor system at the base of animal evolution.** *Molecular biology evolution* 2010, **28**(5):1687-1702.
4. Proell M, Riedl SJ, Fritz JH, Rojas AM, Schwarzenbacher R: **The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences.** *PloS one* 2008, **3**(4):e2119.
5. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A: **The evolution of vertebrate Toll-like receptors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, **102**(27):9577-9582.
6. Ghosh S, May MJ, Kopp EB: **NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.** *Annu Rev Immunol* 1998, **16**(1):225-260.
7. Barton GM: **A calculated response: control of inflammation by the innate immune system.** *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(2):413-420.
8. Medzhitov RJN: **Origin and physiological roles of inflammation.** 2008, **454**(7203):428.
9. Nathan C: **Points of control in inflammation.** *Nature* 2002, **420**(6917):846.
10. Luster AD, Alon R, von Andrian UH: **Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets.** *Nat Immunol* 2005, **6**(12):1182.
11. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S: **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.** *Nature Reviews Immunology* 2007, **7**(9):678.
12. Osborn L: **Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation.** *Cell* 1990, **62**(1):3-6.
13. Zlotnik A, Yoshie O: **The chemokine superfamily revisited.** *immunity* 2012, **36**(5):705-716.
14. Ricklin D, Lambris JD: **Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms.** *The Journal of Immunology* 2013, **190**(8):3831-3838.
15. Medzhitov R: **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature* 2008, **454**(7203):428.
16. Dale DC, Boxer L, Liles WC: **The phagocytes: neutrophils and monocytes.** *Blood* 2008, **112**(4):935-945.
17. Kumar V, Abbas AK, Aster JC: **Robbins basic pathology e-book:** Elsevier Health Sciences; 2017.
18. Serhan CN, Savill J: **Resolution of inflammation: the beginning programs the end.** *Nat Immunol* 2005, **6**(12):1191.
19. Flower RJ, Perretti M: **Controlling inflammation: a fat chance?** *J Exp Med* 2005, **201**(5):671-674.
20. Gilroy Dw, Newson J, Sawmynaden P, Willoughby DA, Croxtall JD: **A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation.** *The FASEB Journal* 2004, **18**(3):489-498.

21. Stables MJ, Gilroy DW: **Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution.** *Prog Lipid Res* 2011, **50**(1):35-51.
22. Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P: **Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions.** *The American journal of pathology* 1999, **155**(4):1281-1291.
23. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimäki A, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T: **Cyclooxygenase-1 and-2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids.** *The Journal of clinical investigation* 1994, **93**(3):1095-1101.
24. Myers LK, Kang AH, Postlethwaite AE, Rosloniec EF, Morham SG, Shlopov BV, Goorha S, Ballou LR: **The genetic ablation of cyclooxygenase 2 prevents the development of autoimmune arthritis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(12):2687-2693.
25. Ochi T, Ohkubo Y, Mutoh S: **Role of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1, on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice.** *Biochem Pharmacol* 2003, **66**(6):1055-1060.
26. Rajakariar R, Yaqoob MM, Gilroy DW: **COX-2 in inflammation and resolution.** *Mol Interv* 2006, **6**(4):199.
27. Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Gordon Letts L: **Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers.** *Curr Top Med Chem* 2007, **7**(3):311-340.
28. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T: **Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(14):8514-8519.
29. Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC: **Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo.** *J Exp Med* 1996, **184**(3):883-891.
30. McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP: **The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *The Journal of clinical investigation* 2002, **110**(5):651-658.
31. Dennis EA, Norris PC: **Eicosanoid storm in infection and inflammation.** *Nature Reviews Immunology* 2015, **15**(8):511.
32. Cavaillon J: **Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms.** *Pathologie-biologie* 1993, **41**(8 Pt 2):799-811.
33. Van de Loo A, Van den Berg W: **Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation.** *Annals of the rheumatic diseases* 1990, **49**(4):238-245.
34. Henderson B, Pettipher E: **Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo.** *Clinical experimental immunology* 1989, **75**(2):306.
35. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G: **Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis.** *The EMBO journal* 1991, **10**(13):4025-4031.
36. Probert L, Plows D, Kontogeorgos G, Kollias G: **The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice.** *Eur J Immunol* 1995, **25**(6):1794-1797.

37. Ghivizzani SC, Kang R, Georgescu HI, Lechman ER, Jaffurs D, Engle JM, Watkins SC, Tindal MH, Suchanek MK, McKenzie LR: **Constitutive intra-articular expression of human IL-1 beta following gene transfer to rabbit synovium produces all major pathologies of human rheumatoid arthritis.** *The Journal of Immunology* 1997, **159**(7):3604-3612.
38. Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, Takaishi H, Fujikawa K, Tada N: **Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis in human IL-1 alpha transgenic mice.** In: *Arthritis Rheum: 1998: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS 227 EAST WASHINGTON SQ, PHILADELPHIA, PA 19106 USA; 1998: S212-S212.*
39. Noack M, Miossec P: **Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis.** *Semin Immunopathol* 2017, **39**(4):365-383.
40. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA: **Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity.** *Ann Rheum Dis* 1993, **52**(3):232-234.
41. Gaffen SL: **The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Curr Rheumatol Rep* 2009, **11**(5):365-370.
42. Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG: **Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies.** *J Allergy Clin Immunol* 2017, **140**(3):645-653.
43. Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J: **Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies.** *Bone research* 2018, **6**:15-15.
44. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS: **Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts.** *Cell Immunol* 2000, **204**(1):19-28.
45. Mosser DM, Zhang X: **Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine.** *Immunol Rev* 2008, **226**(1):205-218.
46. Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma X: **A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1.** *Nat Immunol* 2009, **10**(5):471.
47. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL: **Robbins pathologic basis of disease;** 1999.
48. Serhan C, Chiang N: **Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus.** *Br J Pharmacol* 2008, **153**(S1):S200-S215.
49. Nathan C, Ding A: **Nonresolving inflammation.** *Cell* 2010, **140**(6):871-882.
50. Medzhitov R: **Inflammation 2010: new adventures of an old flame.** *Cell* 2010, **140**(6):771-776.
51. Smolen JS, Steiner G: **Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.** *Nature reviews Drug discovery* 2003, **2**(6):473.
52. Headland SE, Norling LV: **The resolution of inflammation: Principles and challenges.** *Semin Immunol* 2015, **27**(3):149-160.
53. Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M, Teixeira MM: **Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response.** *Trends Immunol* 2019.
54. Dalli J: **Does promoting resolution instead of inhibiting inflammation represent the new paradigm in treating infections?** *Mol Aspects Med* 2017, **58**:12-20.
55. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O: **Resolution of inflammation: an integrated view.** *EMBO Mol Med* 2013, **5**(5):661-674.

56. Serhan CN, Levy BD: **Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators.** *The Journal of clinical investigation* 2018, **128**(6).
57. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN: **Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution.** *Nat Immunol* 2001, **2**(7):612-619.
58. Feehan KT, Gilroy DW: **Is Resolution the End of Inflammation?** *Trends Mol Med* 2019.
59. Fullerton JN, Gilroy DW: **Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier.** *Nature reviews Drug discovery* 2016, **15**(8):551.
60. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL: **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** *The FASEB journal* 2007, **21**(2):325-332.
61. Billman GE, Kang JX, Leaf A: **Prevention of sudden cardiac death by dietary pure ω -3 polyunsaturated fatty acids in dogs.** *Circulation* 1999, **99**(18):2452-2457.
62. Adams S, Lopata AL, Smuts CM, Baatjies R, Jeebhay MF: **Relationship between Serum Omega-3 Fatty Acid and Asthma Endpoints.** *Int J Environ Res Public Health* 2018, **16**(1):43.
63. Suzuki I, Iigo M, Ishikawa C, Kuhara T, Asamoto M, Kunimoto T, Moore MA, Yazawa K, Araki E, Tsuda H: **Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and-9 activities.** *Int J Cancer* 1997, **73**(4):607-612.
64. Akbar U, Yang M, Kurian D, Mohan C: **Omega-3 fatty acids in rheumatic diseases: a critical review.** *JCR: Journal of Clinical Rheumatology* 2017, **23**(6):330-339.
65. Saidane O, Semerano L, Sellam J: **Could omega-3 fatty acids prevent rheumatoid arthritis?** *Joint Bone Spine* 2019, **86**(1):9-12.
66. Geusens P, Wouters C, Nijs J, Jiang Y, Dequeker J: **Long-term effect of omega-3 fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis.** *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 1994, **37**(6):824-829.
67. Shichikawa K, Inoue K, Hirota S, Maeda A, Ota H, Kimura M, Ushiyama T, Tsujimoto M: **Changes in the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Kamitonda, Wakayama, Japan, 1965-1996.** *Annals of the rheumatic diseases* 1999, **58**(12):751-756.
68. Baker KR, Matthan NR, Lichtenstein AH, Niu J, Guermazi A, Roemer F, Grainger A, Nevitt MC, Clancy M, Lewis CE *et al*: **Association of plasma n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids with synovitis in the knee: the MOST study.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(5):382-387.
69. Lobo BW, Lima CKF, Teixeira MS, Silva NL, Takiya CM, Ramos MF, Miranda ALP, Dellamora-Ortiz GM: **Fish oil attenuates persistent inflammatory pain in rats through modulation of TNF- α and resolvins.** *Life Sci* 2016, **152**:30-37.
70. Krönke G, Katzenbeisser J, Uderhardt S, Zaiss MM, Scholtysek C, Schabbauer G, Zarbock A, Koenders MI, Axmann R, Zwerina J: **12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis.** *The Journal of Immunology* 2009, **183**(5):3383-3389.
71. Kao W, Gu R, Jia Y, Wei X, Fan H, Harris J, Zhang Z, Quinn J, Morand E, Yang Y: **A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis.** *Br J Pharmacol* 2014, **171**(17):4087-4096.

72. Serhan CN: **Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology.** *Nature* 2014, **510**(7503):92.
73. Dalli J, Zhu M, Vlasenko NA, Deng B, Haeggström JZ, Petasis NA, Serhan CN: **The novel 13 S, 14 S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype.** *The FASEB Journal* 2013, **27**(7):2573-2583.
74. Dalli J, Colas RA, Serhan CN: **Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions.** *J Scientific reports* 2013, **3**:1940.
75. Serhan CN: **Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms.** *The FASEB Journal* 2017, **31**(4):1273-1288.
76. Lee C-T, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, Brito LCN, Paster BJ, Van Dyke TE: **Resolvin E1 Reverses Experimental Periodontitis and Dysbiosis.** *J Immunol* 2016, **197**(7):2796-2806.
77. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN: **Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes.** *Nature* 2007, **447**(7146):869-874.
78. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA, Serhan CN: **Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1.** *J Exp Med* 2005, **201**(5):713-722.
79. Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, Aderman CM, Chen J, Higuchi A, Hong S, Pravda EA, Majchrzak S, Carper D *et al*: **Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis.** *Nat Med* 2007, **13**(7):868-873.
80. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN: **Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(21):7671-7676.
81. Dornelles FN, Santos DS, Van Dyke TE, Calixto JB, Batista EL, Jr., Campos MM: **In vivo up-regulation of kinin B1 receptors after treatment with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in rat paw.** *J Pharmacol Exp Ther* 2009, **330**(3):756-763.
82. Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, Titos E, Martinez-Clemente M, Lopez-Parra M, Arroyo V *et al*: **Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins.** *FASEB J* 2009, **23**(6):1946-1957.
83. Haworth O, Cernadas M, Yang R, Serhan CN, Levy BD: **Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation.** *Nat Immunol* 2008, **9**(8):873-879.
84. Barden AE, Moghaddami M, Mas E, Phillips M, Cleland LG, Mori TA: **Specialised pro-resolving mediators of inflammation in inflammatory arthritis.** *Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids* 2016, **107**:24-29.
85. Zuo G, Zhang D, Mu R, Shen H, Li X, Wang Z, Li H, Chen G: **Resolvin D2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats.** *Mol Brain* 2018, **11**(1):9.
86. Colby JK, Abdulnour RE, Sham HP, Dalli J, Colas RA, Winkler JW, Hellmann J, Wong B, Cui Y, El-Chemaly S *et al*: **Resolvin D3 and Aspirin-Triggered Resolvin D3 Are Protective for Injured Epithelia.** *Am J Pathol* 2016, **186**(7):1801-1813.

87. Christie PE, Spur BW, Lee TH: **The effects of lipoxin A4 on airway responses in asthmatic subjects.** *Am Rev Respir Dis* 1992, **145**(6):1281-1284.
88. Pertwee RG: **Lipoxin A4 is an allosteric endocannabinoid that strengthens anandamide-induced CB1 receptor activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(51):20781-20782.
89. Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, Israel E, Haley KJ, Serhan CN: **Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness.** *J Immunol* 2007, **178**(1):496-502.
90. Rajasagi NK, Reddy PB, Mulik S, Gjorstrup P, Rouse BT: **Neuroprotectin D1 reduces the severity of herpes simplex virus-induced corneal immunopathology.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, **54**(9):6269-6279.
91. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, Ji RR, Zhu M, Petasis NA: **Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain.** *The FASEB Journal* 2012, **26**(4):1755-1765.
92. Rius B, Duran-Guell M, Flores-Costa R, Lopez-Vicario C, Lopategi A, Alcaraz-Quiles J, Casulleras M, Lozano JJ, Titos E, Claria J: **The specialized proresolving lipid mediator maresin 1 protects hepatocytes from lipotoxic and hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress.** *The FASEB Journal* 2017, **31**(12):5384-5398.
93. Norling L, Headland S, Dalli J, Arnardottir H, Jones H, Haworth O, Serhan C, Perretti M: **Pro-Resolving and Cartilage-Protective Actions of Resolvin D1 in Inflammatory Arthritis.** *JCI Insight* 2016, **1**(5):e85922.
94. Lehmann C, Homann J, Ball A-K, Blöcher R, Kleinschmidt TK, Basavarajappa D, Angioni C, Ferreirós N, Häfner A-K, Rådmark O: **Lipoxin and resolvin biosynthesis is dependent on 5-lipoxygenase activating protein.** *The FASEB Journal* 2015, **29**(12):5029-5043.
95. Leigh NJ, Nelson JW, Mellas RE, Aguirre A, Baker OJ: **Expression of resolvin D1 biosynthetic pathways in salivary epithelium.** *J Dent Res* 2014, **93**(3):300-305.
96. Serhan CN, Petasis NA: **Resolvins and protectins in inflammation resolution.** *Chem Rev* 2011, **111**(10):5922-5943.
97. Crean D, Godson C: **Specialised lipid mediators and their targets.** *Semin Immunol* 2015, **27**(3):169-176.
98. Fredman G, Serhan CN: **Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution.** *Biochem J* 2011, **437**(2):185-197.
99. Cooray SN, Gobbetti T, Montero-Melendez T, McArthur S, Thompson D, Clark AJ, Flower RJ, Perretti M: **Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013, **110**(45):18232-18237.
100. Norling LV, Dalli J, Flower RJ, Serhan CN, Perretti M: **Resolvin D1 limits polymorphonuclear leukocyte recruitment to inflammatory loci: receptor-dependent actions.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012, **32**(8):1970-1978.
101. Schmid M, Gemperle C, Rimann N, Hersberger M: **Resolvin D1 polarizes primary human macrophages toward a proresolution phenotype through GPR32.** *The Journal of Immunology* 2016, **196**(8):3429-3437.

102. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee C-H, Yang R, Petasis NA, Serhan CN: **Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, **107**(4):1660-1665.
103. Wu D, Zheng S, Li W, Yang L, Liu Y, Zheng X, Yang Y, Yang L, Wang Q, Smith FG: **Novel biphasic role of resolvin D1 on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated lung fibroblasts is partly through PI3K/AKT and ERK2 pathways**. *Mediators of inflammation* 2013, **2013**.
104. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Fredman G, Serhan CN: **Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs**. *The American journal of pathology* 2012, **180**(5):2018-2027.
105. Recchiuti A, Krishnamoorthy S, Fredman G, Chiang N, Serhan CN: **MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvin D1-miRNA circuits**. *The FASEB Journal* 2011, **25**(2):544-560.
106. Dalli J, Serhan CN: **Identification and structure elucidation of the pro-resolving mediators provides novel leads for resolution pharmacology**. *Br J Pharmacol* 2018.
107. Kim N, Ramon S, Thatcher TH, Woeller CF, Sime PJ, Phipps RP: **Specialized proresolving mediators (SPMs) inhibit human B-cell IgE production**. *Eur J Immunol* 2016, **46**(1):81-91.
108. Chiurchiu V, Leuti A, Dalli J, Jacobsson A, Battistini L, Maccarrone M, Serhan CN: **Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses**. *Sci Transl Med* 2016, **8**(353):353ra111.
109. Fredman G, Ozcan L, Spolitu S, Hellmann J, Spite M, Backs J, Tabas I: **Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B4 synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(40):14530-14535.
110. Li D, Hodges RR, Jiao J, Carozza RB, Shatos MA, Chiang N, Serhan CN, Dartt DA: **Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 regulate histamine-stimulated conjunctival goblet cell secretion**. *Mucosal Immunol* 2013, **6**(6):1119-1130.
111. Rossi S, Di Filippo C, Gesualdo C, Testa F, Trotta MC, Maisto R, Ferraro B, Ferraraccio F, Accardo M, Simonelli F *et al*: **Interplay between Intravitreal RvD1 and Local Endogenous Sirtuin-1 in the Protection from Endotoxin-Induced Uveitis in Rats**. *Mediators Inflamm* 2015, **2015**:126408.
112. Settimio R, Clara DF, Franca F, Francesca S, Michele DA: **Resolvin D1 reduces the immunoinflammatory response of the rat eye following uveitis**. *Mediators of inflammation* 2012, **2012**:318621-318621.
113. Gilbert K, Bernier J, Godbout R, Rousseau G: **Resolvin D1, a metabolite of omega-3 polyunsaturated fatty acid, decreases post-myocardial infarct depression**. *Mar Drugs* 2014, **12**(11):5396-5407.
114. Xu Z-Z, Ji R-R: **Resolvins are potent analgesics for arthritic pain**. *Br J Pharmacol* 2011, **164**(2):274-277.
115. Huang L, Wang CF, Serhan CN, Strichartz G: **Enduring prevention and transient reduction of postoperative pain by intrathecal resolvin D1**. *Pain* 2011, **152**(3):557-565.
116. Zhao Y-L, Zhang L, Yang Y-Y, Tang Y, Zhou J-J, Feng Y-Y, Cui T-L, Liu F, Fu P: **Resolvin D1 Protects Lipopolysaccharide-induced Acute Kidney Injury by Down-**

- regulating Nuclear Factor-kappa B Signal and Inhibiting Apoptosis. *Chinese medical journal* 2016, **129**(9):1100-1107.
117. Tang Y, Zhang MJ, Hellmann J, Kosuri M, Bhatnagar A, Spite M: **Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds.** *Diabetes* 2013, **62**(2):618-627.
118. Sulciner ML, Serhan CN, Gilligan MM, Mudge DK, Chang J, Gartung A, Lehner KA, Bielenberg DR, Schmidt B, Dalli J *et al*: **Resolvins suppress tumor growth and enhance cancer therapy.** *J Exp Med* 2018, **215**(1):115-140.
119. Tang H, Liu Y, Yan C, Petasis NA, Serhan CN, Gao H: **Protective Actions of Aspirin-Triggered (17R) Resolvin D1 and Its Analogue, 17R-Hydroxy-19-Para-Fluorophenoxy-Resolvin D1 Methyl Ester, in C5a-Dependent IgG Immune Complex-Induced Inflammation and Lung Injury.** *The Journal of Immunology* 2014, **193**(7):3769-3778.
120. Hsiao HM, Thatcher TH, Levy EP, Fulton RA, Owens KM, Phipps RP, Sime PJ: **Resolvin D1 attenuates polyinosinic-polycytidylic acid-induced inflammatory signaling in human airway epithelial cells via TAK1.** *J Immunol* 2014, **193**(10):4980-4987.
121. Cox R, Jr., Phillips O, Fukumoto J, Fukumoto I, Parthasarathy PT, Arias S, Cho Y, Lockey RF, Kolliputi N: **Enhanced Resolution of Hyperoxic Acute Lung Injury as a result of Aspirin Triggered Resolvin D1 Treatment.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015, **53**(3):422-435.
122. Eickmeier O, Seki H, Haworth O, Hilberath JN, Gao F, Uddin M, Croze RH, Carlo T, Pfeffer MA, Levy BD: **Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury.** *Mucosal Immunol* 2013, **6**(2):256-266.
123. Rogério AP, Haworth O, Croze R, Oh SF, Uddin M, Carlo T, Pfeffer MA, Priluck R, Serhan CN, Levy BD: **Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 promote resolution of allergic airways responses.** *J Immunol* 2012, **189**(4):1983-1991.
124. Frediani JK, Jones DP, Tukvadze N, Uppal K, Sanikidze E, Kipiani M, Tran VT, Hebbar G, Walker DI, Kempker RR: **Plasma metabolomics in human pulmonary tuberculosis disease: a pilot study.** *PloS one* 2014, **9**(10):e108854.
125. Fredman G, Hellmann J, Proto JD, Kuriakose G, Colas RA, Dorweiler B, Connolly ES, Solomon R, Jones DM, Heyer EJ: **An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques.** *Nature communications* 2016, **7**:12859.
126. Dmitrieva N, Suess G, Shirley R, sterility: **Resolvins RvD1 and 17 (R)-RvD1 alleviate signs of inflammation in a rat model of endometriosis.** *Fertility* 2014, **102**(4):1191-1196.
127. Xu ZZ, Ji RR: **Resolvins are potent analgesics for arthritic pain.** *Br J Pharmacol* 2011, **164**(2):274-277.
128. Norling LV, Perretti M: **The role of omega-3 derived resolvins in arthritis.** *Curr Opin Pharmacol* 2013, **13**(3):476-481.
129. Hellmann J, Tang Y, Kosuri M, Bhatnagar A, Spite M: **Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice.** *The FASEB journal* 2011, **25**(7):2399-2407.

130. Drake Richard L, Vogl W, Mitchell AW: **Gray's Anatomie pour les Étudiants**: Elsevier Masson. SAS. 287p, 311p, 313p, 316p; 2006.
131. Ross Michael H: **Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology**/Michael H. Ross, Wojciech Pawlina: Philadelphia: Wolters Kluwer Health,-2016.-984 p; 2010.
132. Mitchell B, Peel S: **Histology E-Book: An Illustrated Colour Text**: Elsevier Health Sciences; 2009.
133. Ovalle WK, Nahirney PC: **Netter's Essential Histology: with Student Consult Access**: Elsevier Health Sciences; 2013.
134. Bhosale AM, Richardson JB: **Articular cartilage: structure, injuries and review of management**. *Br Med Bull* 2008, **87**:77-95.
135. Archer CW, Francis-West P: **The chondrocyte**. *Int J Biochem Cell Biol* 2003, **35**(4):401-404.
136. Rupp M, Merboth F, Daghma DE, Biehl C, El Khassawna T, Heiss C: **Osteocytes**. *Z Orthop Unfall* 2019, **157**(2):154-163.
137. Allan DA: **Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries**. *Clin Orthop Relat Res* 1998(351):32-38.
138. Bonnans C, Chou J, Werb Z: **Remodelling the extracellular matrix in development and disease**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**(12):786-801.
139. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ: **Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model**. *J Bone Joint Surg Br* 2007, **89**(5):672-685.
140. Sah RL, Trippel SB, Grodzinsky AJ: **Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture**. *J Orthop Res* 1996, **14**(1):44-52.
141. Xie Y, Liu X, Wang S, Wang M, Wang G: **Proper mechanical stimulation improve the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Improve the viscoelasticity and chondrogenic phenotype**. *Biomed Pharmacother* 2019, **115**:108935.
142. Vayas R, Reyes R, Rodriguez-Evora M, Del Rosario C, Delgado A, Evora C: **Evaluation of the effectiveness of a bMSC and BMP-2 polymeric trilayer system in cartilage repair**. *Biomed Mater* 2017, **12**(4):045001.
143. Rodan GA: **Bone homeostasis**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(23):13361-13362.
144. Hadjidakis DJ, Androulakis, II: **Bone remodeling**. *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1092**:385-396.
145. Rucci N: **Molecular biology of bone remodelling**. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2008, **5**(1):49-56.
146. Liu W, Xu C, Zhao H, Xia P, Song R, Gu J, Liu X, Bian J, Yuan Y, Liu Z: **Osteoprotegerin Induces Apoptosis of Osteoclasts and Osteoclast Precursor Cells via the Fas/Fas Ligand Pathway**. *PloS one* 2015, **10**(11):e0142519-e0142519.
147. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J: **An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level**. *Clin Biochem* 2012, **45**(12):863-873.
148. Wein MN, Kronenberg HM: **Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018, **8**(8).
149. Goldring MB: **The role of the chondrocyte in osteoarthritis**. *Arthritis Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2000, **43**(9):1916-1926.

150. Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, Iizuka N, Urabe K, Itoman M, Hirohata S: **Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis.** *The Journal of rheumatology* 2007, **34**(11):2144-2153.
151. Felson DT: **Clinical practice. Osteoarthritis of the knee.** *N Engl J Med* 2006, **354**(8):841-848.
152. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB: **Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**(6):1697-1707.
153. Goldring MB, Goldring SR: **Osteoarthritis.** *J Cell Physiol* 2007, **213**(3):626-634.
154. Bombardier C, Hawker G, Mosher D: **The impact of arthritis in Canada: today and over the next 30 years.** *Arthritis Alliance of Canada* 2011, **606**:1-52.
155. MacDonald KV, Sanmartin C, Langlois K, Marshall DA: **Symptom onset, diagnosis and management of osteoarthritis.** *Health Rep* 2014, **25**(9):10-17.
156. Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C: **Epidemiology and burden of osteoarthritis.** *Br Med Bull* 2013, **105**:185-199.
157. Shen J, Abu-Amer Y, O'Keefe RJ, McAlinden A: **Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis.** *Connect Tissue Res* 2017, **58**(1):49-63.
158. Malemud CJ: **Biologic basis of osteoarthritis: state of the evidence.** *Curr Opin Rheumatol* 2015, **27**(3):289-294.
159. Funck-Brentano T, Cohen-Solal M: **Subchondral bone and osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2015, **27**(4):420-426.
160. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivotto E, Borzi RM *et al*: **Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis.** *European cells & materials* 2011, **21**:202-220.
161. Goldring M, Berenbaum F: **Human chondrocyte culture models for studying cyclooxygenase expression and prostaglandin regulation of collagen gene expression.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**(4):386-388.
162. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, Shah M, Thompson EW: **Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(12):3723-3733.
163. Mathiessen A, Conaghan PG: **Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications.** *Arthritis research & therapy* 2017, **19**(1):18-18.
164. Berenbaum F: **Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!).** *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**(1):16-21.
165. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D: **The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis.** *Mediators Inflamm* 2014, **2014**:561459.
166. Goldring MB, Otero M: **Inflammation in osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2011, **23**(5):471-478.
167. Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB: **NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA.** *Curr Drug Targets* 2010, **11**(5):599-613.
168. Webb GR, Westacott CI, Elson CJ: **Chondrocyte tumor necrosis factor receptors and focal loss of cartilage in osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 1997, **5**(6):427-437.

169. Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, Sarfati M, Pelletier JP: **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**(5):530-540.
170. Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA: **The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(9):1061-1069.
171. Yorimitsu M, Nishida K, Shimizu A, Doi H, Miyazawa S, Komiyama T, Nasu Y, Yoshida A, Watanabe S, Ozaki T: **Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints.** *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(7):764-771.
172. Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(4):710-718.
173. Behrendt P, Feldheim M, Preusse-Prange A, Weitkamp JT, Haake M, Eglin D, Rolauffs B, Fay J, Seekamp A, Grodzinsky AJ *et al*: **Chondrogenic potential of IL-10 in mechanically injured cartilage and cellularized collagen ACI grafts.** *Osteoarthritis Cartilage* 2018, **26**(2):264-275.
174. Faour WH, He Y, He QW, de Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A, Di Battista JA: **Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts.** *J Biol Chem* 2001, **276**(34):31720-31731.
175. Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, Stuchin SA, Patel IR, Abramson SB: **Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide.** *J Clin Invest* 1997, **99**(6):1231-1237.
176. Suzawa T, Miyaura C, Inada M, Maruyama T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Suda T: **The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs.** *Endocrinology* 2000, **141**(4):1554-1559.
177. Attur M, Al-Mussawir HE, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G, Pillinger MH, Abramson SB: **Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor.** *J Immunol* 2008, **181**(7):5082-5088.
178. Tchetcherikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TWJ, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, DeGroot J: **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):694-698.
179. Karan A, Karan MA, Vural P, Erten N, Tascioglu C, Aksoy C, Canbaz M, Oncel A: **Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis.** *Clin Rheumatol* 2003, **22**(6):397-399.
180. Wu GJ, Chen TG, Chang HC, Chiu WT, Chang CC, Chen RM: **Nitric oxide from both exogenous and endogenous sources activates mitochondria-dependent events and induces insults to human chondrocytes.** *J Cell Biochem* 2007, **101**(6):1520-1531.

181. Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu HI, Rizzo CF, Hebda PA, Stefanovic-Racic M, Evans CH: **Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target.** *The Biochemical journal* 1997, **324 (Pt 1)**(Pt 1):305-310.
182. Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T, Takahashi K, Inoue H, Takigawa M: **Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes.** *J Biochem* 1998, **123**(3):431-439.
183. Stefanovic-Racic M, Meyers K, Meschter C, Coffey JW, Hoffman RA, Evans CH: **N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats.** *Arthritis Rheum* 1994, **37**(7):1062-1069.
184. Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J: **Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors.** *J Rheumatol* 1999, **26**(9):2002-2014.
185. Martin JA, Buckwalter JA: **Post-traumatic osteoarthritis: the role of stress induced chondrocyte damage.** *Biorheology* 2006, **43**(3,4):517-521.
186. Yudoh K, Nguyen v T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K: **Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**(2):R380-391.
187. Yusuf E: **Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis.** *Current Treatment Options in Rheumatology* 2016, **2**(2):111-125.
188. Hermann W, Lambova S, Muller-Ladner U: **Current Treatment Options for Osteoarthritis.** *Curr Rheumatol Rev* 2018, **14**(2):108-116.
189. Scott D, Smith C, Kingsley G: **Joint damage and disability in rheumatoid arthritis: an updated systematic review.** *Clinical and experimental rheumatology* 2003, **21**(5; SUPP 31):S20-S27.
190. Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C: **The clinical features of rheumatoid arthritis.** *Eur J Radiol* 1998, **27 Suppl 1**:S18-24.
191. Jeffery RC: **Clinical features of rheumatoid arthritis.** *Medicine* 2014, **42**(5):231-236.
192. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW: **Rheumatoid arthritis.** *The Lancet* 2010, **376**(9746):1094-1108.
193. Xu B, Lin J: **Characteristics and risk factors of rheumatoid arthritis in the United States: an NHANES analysis.** *PeerJ* 2017, **5**:e4035-e4035.
194. Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI: **Smoking and rheumatoid arthritis.** *Int J Mol Sci* 2014, **15**(12):22279-22295.
195. Alam J, Jantan I, Bukhari SNA: **Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy.** *Biomed Pharmacother* 2017, **92**:615-633.
196. Morovic-Vergles J: **[Pathophysiology of rheumatoid arthritis].** *Reumatizam* 2003, **50**(2):15-17.
197. Firestein GS: **Mechanisms of tissue destruction and cellular activation in rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 1992, **4**(3):348-354.
198. Firestein GS, McInnes IB: **Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis.** *Immunity* 2017, **46**(2):183-196.

199. Bresnihan B: **Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1999, **26**(3):717-719.
200. Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester G-R: **Macrophages in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Research & Therapy* 2000, **2**(3):189.
201. Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G, Kinne RW: **Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis?** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(1):5-18.
202. Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester G-R: **Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages.** *Arthritis research & therapy* 2007, **9**(6):224-224.
203. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M: **Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2016, **12**(8):472-485.
204. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B: **Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**(1):115-124.
205. Barrera P, Blom A, van Lent PL, van Bloois L, Beijnen JH, van Rooijen N, de Waal Malefijt MC, van de Putte LB, Storm G, van den Berg WB: **Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**(9):1951-1959.
206. Salmon M, Gaston JS: **The role of T-lymphocytes in rheumatoid arthritis.** *Br Med Bull* 1995, **51**(2):332-345.
207. Summers KL, O'Donnell JL, Hart DN: **Co-expression of the CD45RA and CD45RO antigens on T lymphocytes in chronic arthritis.** *Clin Exp Immunol* 1994, **97**(1):39-44.
208. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, Takahashi K, Furuya T, Ishiyama S, Kim KJ *et al*: **Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(5):1003-1012.
209. Silverman GJ, Carson DA: **Roles of B cells in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2003, **5**(4):S1.
210. Jones DH, Kong YY, Penninger JM: **Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis.** *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002, **61**(suppl 2):ii32.
211. Redlich K, Smolen JS: **Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention.** *Nature reviews Drug discovery* 2012, **11**(3):234-250.
212. Hayer S, Redlich K, Korb A, Hermann S, Smolen J, Schett G: **Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis.** *Arthritis & Rheumatology* 2007, **56**(1):79-88.
213. Schett G: **Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts.** *Arthritis Research & Therapy* 2007, **9**(1):203-203.
214. Bolon B, Morony S, Cheng Y, Hu YL, Feige U: **Osteoclast numbers in Lewis rats with adjuvant-induced arthritis: identification of preferred sites and parameters for rapid quantitative analysis.** *Vet Pathol* 2004, **41**(1):30-36.
215. Kuratani T, Nagata K, Kukita T, Hotokebuchi T, Nakasima A, Iijima T: **Induction of abundant osteoclast-like multinucleated giant cells in adjuvant arthritic rats with accompanying disordered high bone turnover.** *Histol Histopathol* 1998, **13**(3):751-759.
216. Otero M, Goldring MB: **Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes.** *Arthritis research & therapy* 2007, **9**(5):220-220.

217. Brennan FM, McInnes IB: **Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis.** *The Journal of Clinical Investigation* 2008, **118**(11):3537-3545.
218. Alunno A, Carubbi F, Giacomelli R, Gerli R: **Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets.** *BMC Rheumatology* 2017, **1**(1):3.
219. Gabay C: **Cytokine inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis.** *Expert Opin Biol Ther* 2002, **2**(2):135-149.
220. Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Nam JL, Smolen JS, Buch M, Gossec L, van der Heijde D, Winthrop K, Landewé R: **Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2014, **73**(3):529-535.
221. Gaujoux-Viala C, Nam J, Ramiro S, Landewé R, Buch MH, Smolen JS, Gossec L: **Efficacy of conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs, glucocorticoids and tofacitinib: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2014:annrhumdis-2013-204588.
222. Hawtree S, Muthana M, Wilson AG: **The role of histone deacetylases in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes.** *Biochem Soc Trans* 2013, **41**:783-788.
223. Akramas L, Leonavičienė L, Vasiliauskas A, Bradūnaitė R, Vaitkienė D, Zabulytė D, Normantienė T, Lukošius A, Jonauskienė I: **Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of herbal preparation EM 1201 in adjuvant arthritic rats.** *Medicina* 2015, **51**(6):368-377.
224. Heidari B: **Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes.** *Caspian journal of internal medicine* 2011, **2**(1):161-170.
225. Bornstein C, Craig M, Tin D: **Practice guidelines for pharmacists: The pharmacological management of rheumatoid arthritis with traditional and biologic disease-modifying antirheumatic drugs.** *Canadian Pharmacists Journal/Revue des Pharmaciens du Canada* 2014, **147**(2):97-109.
226. Lima-Garcia JF, Dutra RC, da Silva K, Motta EM, Campos MM, Calixto JB: **The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats.** *Br J Pharmacol* 2011, **164**(2):278-293.
227. Sun AR, Wu X, Liu B, Chen Y, Armitage CW, Kollipara A, Crawford R, Beagley KW, Mao X, Xiao Y *et al*: **Pro-resolving lipid mediator ameliorates obesity induced osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarisation.** *Sci Rep* 2019, **9**(1):426.
228. Gheorghe KR, Korotkova M, Catrina AI, Backman L, Af Klint E, Claesson H-E, Rådmark O, Jakobsson P-J, therapy: **Expression of 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase in rheumatoid arthritis synovium and effects of intraarticular glucocorticoids.** *Arthritis Research & Therapy* 2009, **11**(3):R83.
229. Ishiguro N, Ito T, Oguchi T, Kojima T, Iwata H, Ionescu M, Poole AR: **Relationships of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheumatism* 2001, **44**(11):2503-2511.

230. Lotz M: **The role of nitric oxide in articular cartilage damage.** *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1999, **25**(2):269-282.
231. Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, Im H-J: **A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain.** *Gene* 2013, **527**(2):440-447.
232. Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins P, Evans CH: **Nitric oxide in osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**(4):377-379.
233. Li H, Wang D, Yuan Y, Min J: **New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis.** *Arthritis Research & Therapy* 2017, **19**(1):248.
234. Thomas B, Jones H, Norling L, Headland S, Pitzalis C, Dell'Accio F, Perretti M: **Neutrophil extracellular vesicles have a cartilage protective effect during inflammatory arthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2018, **26**:S125-S126.
235. Ridley SH, Sarsfield SJ, Lee JC, Bigg HF, Cawston TE, Taylor DJ, DeWitt DL, Saklatvala J: **Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels.** *The Journal of Immunology* 1997, **158**(7):3165-3173.
236. Badger AM, Griswold DE, Kapadia R, Blake S, Swift BA, Hoffman SJ, Stroup GB, Webb E, Rieman DJ, Gowen M: **Disease-modifying activity of SB 242235, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in rat adjuvant-induced arthritis.** *Arthritis Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2000, **43**(1):175-183.
237. Lee H-N, Kundu JK, Cha Y-N, Surh Y-J: **Resolvin D1 stimulates efferocytosis through p50/p50-mediated suppression of tumor necrosis factor- α expression.** *J Cell Sci* 2013, **126**(17):4037-4047.
238. Xu J, Duan X, Hu F, Poorun D, Liu X, Wang X, Zhang S, Gan L, He M, Zhu K: **Resolvin D1 attenuates imiquimod-induced mice psoriasisform dermatitis through MAPKs and NF- κ B pathways.** *J Dermatol Sci* 2018, **89**(2):127-135.
239. Mottola G, Chatterjee A, Wu B, Chen M, Conte MS: **Aspirin-triggered resolvin D1 attenuates PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration via the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) pathway.** *PloS one* 2017, **12**(3):e0174936.
240. Zheng S, Wang Q, D'Souza V, Bartis D, Dancer R, Parekh D, Gao Smith F, Lian Q, Jin S, Thickett D: **Resolvin D1 stimulates epithelial wound repair and inhibits TGF-induced EMT whilst reducing fibroproliferation and collagen production.**
241. Gao Y, Zhang H, Luo L, Lin J, Li D, Zheng S, Huang H, Yan S, Yang J, Hao Y: **Resolvin D1 improves the resolution of inflammation via activating NF- κ B p50/p50-mediated cyclooxygenase-2 expression in acute respiratory distress syndrome.** *The Journal of Immunology* 2017, **199**(6):2043-2054.
242. Kim H, Blanco F: **Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage.** *Current drug targets* 2007, **8**(2):333-345.
243. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: **Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.** *Cell* 1993, **74**(4):609-619.
244. Vaillancourt F, Morquette B, Shi Q, Fahmi H, Lavigne P, Di Battista JA, Fernandes JC, Benderdour M: **Differential regulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric**

- oxide synthase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes through ATF-2/CREB-1 transactivation and concomitant inhibition of NF-kappaB signaling cascade. *J Cell Biochem* 2007, **100**(5):1217-1231.**
245. Shi Q, Abusarah J, Zaouter C, Moldovan F, Fernandes JC, Fahmi H, Benderdour M: **New evidence implicating 4-hydroxynonenal in the pathogenesis of osteoarthritis in vivo.** *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)* 2014, **66**(9):2461-2471.
246. Zheng S, Wang Q, D'Souza V, Bartis D, Dancer R, Parekh D, Gao F, Lian Q, Jin S, Thickett DR: **Resolvin D 1 stimulates epithelial wound repair and inhibits TGF- β -induced EMT whilst reducing fibroproliferation and collagen production.** *Lab Invest* 2018, **98**(1):130.
247. Xie W, Wang H, Wang L, Yao C, Yuan R, Wu Q: **Resolvin D1 reduces deterioration of tight junction proteins by upregulating HO-1 in LPS-induced mice.** *Lab Invest* 2013, **93**(9):991.
248. Kaye R, Botten N, Lippestad M, Li D, Hodges RR, Utheim TP, Serhan CN, Dartt DA: **Resolvin D1, but not resolvin E1, transactivates the epidermal growth factor receptor to increase intracellular calcium and glycoconjugate secretion in rat and human conjunctival goblet cells.** *Exp Eye Res* 2019, **180**:53-62.
249. Jung TW, Hwang H-J, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Baik SH, Choi KM: **Resolvin D1 reduces ER stress-induced apoptosis and triglyceride accumulation through JNK pathway in HepG2 cells.** *Molecular cellular endocrinology* 2014, **391**(1-2):30-40.
250. Lee HN, Surh YJ: **Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis.** *Biochem Pharmacol* 2013, **86**(6):759-769.
251. Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Anomasiri W, Deepaisarnsakul B, Honsawek S: **Oxidative stress, vitamin e, and antioxidant capacity in knee osteoarthritis.** *Journal of clinical diagnostic research: JCDR* 2013, **7**(9):1855.
252. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T: **Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**(8):643-654.
253. Bentz M, Zaouter C, Shi Q, Fahmi H, Moldovan F, Fernandes JC, Benderdour M: **Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes.** *J Cell Biochem* 2012, **113**(7):2256-2267.
254. Ahmad R, Sylvester J, Ahmad M, Zafarullah M: **Involvement of H-Ras and reactive oxygen species in proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes.** *Arch Biochem Biophys* 2011, **507**(2):350-355.
255. Tiku ML, Allison GT, Naik K, Karry SK: **Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**(3):159-166.
256. Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA: **Redox-control of matrix metalloproteinase-1: a critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease.** *Respir Physiol Neurobiol* 2010, **174**(3):299-306.
257. Saito P, Melo CPB, Martinez RM, Fattori V, Cezar TLC, Pinto IC, Bussmann AJC, Vignoli JA, Georgetti SR, Baracat MM *et al*: **The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice.** *Front Pharmacol* 2018, **9**:1242-1242.

258. Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, Morán-Salvador E, Martínez-Clemente M, Arroyo V, Clària J: **Resolvin D1 and its precursor docosa-hexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype.** *The Journal of Immunology* 2011, **187**(10):5408-5418.
259. Skoumal M, Haberhauer G, Kolarz G, Hawa G, Woloszczuk W, Klingler A: **Serum cathepsin K levels of patients with longstanding rheumatoid arthritis: correlation with radiological destruction.** *Arthritis research & therapy* 2005, **7**(1):R65-R70.
260. Moura RA, Cascão R, Perpétuo I, Canhão H, Sousa E, Mourão AF, Rodrigues AM, Polido-Pereira J, Viana Queiroz M, Rosário HS *et al*: **Cytokine profile in serum and synovial fluid of patients with established rheumatoid arthritis.** *Annals of the Rheumatic Diseases* 2010, **69**(Suppl 2):A51.
261. Saribal D, Hocaoglu-Emre FS, Erdogan S, Bahtiyar N, Caglar Okur S, Mert M: **Inflammatory cytokines IL-6 and TNF-alpha in patients with hip fracture.** *Osteoporos Int* 2019, **30**(5):1025-1031.
262. Sun P, Liu Y, Deng X, Yu C, Dai N, Yuan X, Chen L, Yu S, Si W, Wang X: **An inhibitor of cathepsin K, icariin suppresses cartilage and bone degradation in mice of collagen-induced arthritis.** *Phytomedicine* 2013, **20**(11):975-979.
263. Salminen-Mankonen H, Morko J, Vuorio E: **Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis.** *Current drug targets* 2007, **8**(2):315-323.
264. Morko J, Kiviranta R, Joronen K, Saamanen AM, Vuorio E, Salminen-Mankonen H: **Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**(12):3713-3717.
265. Schett G: **Autoimmunity as a trigger for structural bone damage in rheumatoid arthritis.** *Modern rheumatology* 2017, **27**(2):193-197.
266. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, Goldring SR: **Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor.** *Arthritis & Rheumatology* 2000, **43**(2):250-258.
267. Tanaka S: **RANKL is a therapeutic target of bone destruction in rheumatoid arthritis.** *F1000Research* 2019, **8**.
268. Gu Z, Lamont GJ, Lamont RJ, Uriarte SM, Wang H, Scott DA: **Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3 β anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes.** *Innate immunity* 2016, **22**(3):186-195.
269. Boeyens JC, Deepak V, Chua W-H, Kruger MC, Joubert AM, Coetzee M: **Effects of ω 3-and ω 6-polyunsaturated fatty acids on RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264. 7 cells: a comparative in vitro study.** *Nutrients* 2014, **6**(7):2584-2601.
270. Yuan J, Akiyama M, Nakahama K-i, Sato T, Uematsu H, Morita I: **The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro.** *Prostaglandins & other lipid mediators* 2010, **92**(1-4):85-90.
271. Kasonga AE, Deepak V, Kruger MC, Coetzee M: **Arachidonic acid and docosa-hexaenoic acid suppress osteoclast formation and activity in human CD14+ monocytes, in vitro.** *PLoS One* 2015, **10**(4):e0125145.
272. Cao D, Pi J, Shan Y, Tang Y, Zhou P: **Anti-inflammatory effect of Resolvin D1 on LPS-treated MG-63 cells.** *Exp Ther Med* 2018, **16**(5):4283-4288.

273. McCauley LK, Dalli J, Koh AJ, Chiang N, Serhan CN: **Cutting edge: Parathyroid hormone facilitates macrophage efferocytosis in bone marrow via proresolving mediators resolvin D1 and resolvin D2.** *J Immunol* 2014, **193**(1):26-29.
274. Gaudin A, Tolar M, Peters OA: **Lipoxin A4 Attenuates the Inflammatory Response in Stem Cells of the Apical Papilla via ALX/FPR2.** *Sci Rep* 2018, **8**(1):8921.
275. Petri MH, Thul S, Andonova T, Lindquist-Liljeqvist M, Jin H, Skenteris NT, Arnardottir H, Maegdefessel L, Caidahl K, Perretti M *et al*: **Resolution of Inflammation Through the Lipoxin and ALX/FPR2 Receptor Pathway Protects Against Abdominal Aortic Aneurysms.** *JACC Basic to translational science* 2018, **3**(6):719-727.
276. Zhang Z, Hu X, Qi X, Di G, Zhang Y, Wang Q, Zhou Q: **Resolvin D1 promotes corneal epithelial wound healing and restoration of mechanical sensation in diabetic mice.** *Mol Vis* 2018, **24**:274-285.
277. Pirault J, Back M: **Lipoxin and Resolvin Receptors Transducing the Resolution of Inflammation in Cardiovascular Disease.** *Front Pharmacol* 2018, **9**:1273.
278. Garnero P, Landewe R, Boers M, Verhoeven A, Van Der Linden S, Christgau S, Van Der Heijde D, Boonen A, Geusens P: **Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA study.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(11):2847-2856.
279. Ing SW, Orchard TS, Lu B, LaMonte MJ, Barbour KE, Cauley JA, Jackson RD: **TNF Receptors Predict Hip Fracture Risk in the WHI Study and Fatty Acid Intake Does Not Modify This Association.** *J Clin Endocrinol Metab* 2015, **100**(9):3380-3387.
280. Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, Brown JP, Cohen A, Kim H: **A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy.** *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 2013, **9**(1):30-30.
281. Feehan KT, Gilroy DW: **Is Resolution the End of Inflammation?** *Trends Mol Med* 2019, **25**(3):198-214.

In vitro and in vivo assessment of the proresolutive and antiresorptive actions of resolvin D1: relevance to arthritis

Houda Benabdoun^{1,2}, Merve Kulbay², Elsa-Patricia Rondon², Francis Vallières², Qin Shi², Julio Fernandes^{2,3}, Hassan Fahmi⁴, Mohamed Benderdour^{2,3}.

¹ Department of Pharmacology and physiology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

² Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montreal, QC, Canada.

³ Department of Surgery, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

⁴ Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada; Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

Houda Benabdoun: houda.abir.benabdoune@umontreal.ca

Merve Kulbay: mervekulbay@hotmail.com

Patricia Elsa Rondon: elsa.patricia.rondon-cavanzo@umontreal.ca

Francis Vallières: f.vallieres@umontreal.ca

Qin Shi: qin.shi@umontreal.ca

Julio Fernandes: julio.c.fernandes@umontreal.ca

Hassan Fahmi: h.fahmi@umontreal.ca

Mohamed Benderdour: mohamed.benderdour@umontreal.ca

Running title: The role of RvD1 in arthritis

Keywords: Arthritis, inflammation, resolvin D1, bone resorption, mice.

Address reprint requests and other correspondence to Dr. Mohamed Benderdour, Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Room K-3045, 5400 Gouin Blvd. West, Montreal (QC) Canada H4J 1C5; Telephone: (514) 338-2222 (Extension 3279); Fax: (514) 338-2694. Email: mohamed.benderdour@umontreal.ca

ABSTRACT

BACKGROUND: Resolvin D1 (RvD1), an important member of resolvins, exerts a wide spectrum of biological effects, including resolution of inflammation, tissue repair and preservation of cell viability. The aim of the present study is to investigate the anti-arthritic potential and clarify the bone protective actions of RvD1 *in vitro* and *in vivo*.

METHODS: RAW264.7 cells were treated with 50 ng/ml LPS for 72 h in the presence or absence of RvD1 (0-500 nM). Primary human monocytes were treated with M-CSF + RANKL for 14 days \pm RvD1 (0-500 nM) with or without siRNA against RvD1 receptor FPR2. Expressions of inflammatory mediators, degrading enzymes, osteoclasts (OC) formation, and bone resorption were analyzed. The therapeutic effect of RvD1 (0-1000 ng) was studied out in murine collagen antibody-induced arthritis. Arthritis scoring, joint histology, as well as inflammatory and bone turnover markers were measured. **RESULTS:** RvD1 is not toxic and inhibits OC differentiation and activation. It decreases bone resorption, as assessed by the inhibition of TRAP and cathepsin K expression, hydroxyapatite matrix resorption, and bone loss. In addition, RvD1 reduces TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , PGE₂, and RANK and concurrently enhances IL-10 in OC. Moreover, in arthritic mice, RvD1 alleviates clinical score, paw inflammation, and bone and joint destructions. Besides, RvD1 reduces inflammatory mediators and markedly decreases serum markers of bone and cartilage turnover.

CONCLUSION: Our results provide additional evidence that RvD1 plays a key role in preventing bone resorption and other pathophysiological changes associated with arthritis. The study highlights the clinical relevance of RvD1 as a potential compound for the treatment of inflammatory arthritis and related bone disorders.

Keywords: Arthritis, inflammation, resolvin D1, joint, bone resorption, mice.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic immune-mediated inflammatory disease that features persistent inflammation leading to joint tissue destruction [1]. Afflicting up to 1% of the general population worldwide, women are three to five times more likely to develop RA than men [2, 3]. Highly debilitating, RA leads to impair joint function, in addition to severe pulmonary, renal and cardiovascular dysfunctions, thereby affecting patient's quality of life and significantly decreasing their life expectancy [3, 4]. Joint injuries are associated with excessive synovial inflammation and hyperplasia which promotes recruitment of inflammatory cells [5]. These activated cells will further induce excessive release of pro-inflammatory and catabolic mediators within the joint, thereby causing cartilage and bone breakdown [5-7].

Due to the central role of the immune system and inflammation in the pathogenesis of RA, current therapies mainly target inflammatory mediators such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL6) [8]. However, even if the currently available therapies such as disease-modifying anti-rheumatic drugs improve RA symptoms, they are effective in only half of the treated patients [9, 10]. Moreover, the severe side effects attributed to the long term and high dosage usage limit their use [8].

Most importantly, none of these agents repair or even control joint damage [10, 11]. This underlines the importance of finding alternative pathophysiological pathways that could identify a new target leading, in terms, to a more adequate management of RA.

Hence, 2015 international recommendations for RA treatment set a dozen goals, the main one being to improve patients' long-term quality of life, by reducing symptoms and preventing irreversible joint damage. They have pointed out not only controlling, but eliminating inflammation as the most effective way to achieve it [12]. Promoting the resolution of inflammation could be one effective way to reach this goal. Indeed, the identification of the resolution phase of inflammation as an active process, once believed to be passive, has highlighted the fact that there is a fine line between sufficiently strong inflammation and uncontrolled chronic inflammatory responses seen in inflammatory diseases such as RA. Failure in the resolution responses may therefore be responsible for that line being overpassed [13, 14].

The resolution process is orchestrated by a number of mediators such as resolvins [15]. They are derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, with well-described anti-inflammatory and proresolutive activities [16, 17]. By counter-regulating pro-inflammatory mediators and decreasing neutrophil recruitment in inflammatory sites, these mediators actively trigger the resolution of inflammation and promote the return to homeostasis [18, 19]. Resolvin D1 (RvD1), an important member of resolvins, is biosynthesized from the omega-3 docosahexaenoic acid (DHA; C22:6) via 15-lipoxygenase (15-LOX) and 5-LOX interactions in humans [20, 21]. RvD1 properties encompass a wide spectrum, ranging from potent anti-inflammatory and pro-resolutive actions, to analgesic properties in inflammatory pain [20-23]. Moreover, we previously reported that RvD1 level is higher in knee synovial fluid from patients with osteoarthritis [24]. We, furthermore, demonstrated the potency of RvD1 in controlling inflammatory and catabolic responses, in human osteoarthritic chondrocytes.

Aiming to extend our research on the potential of RvD1 effects in inflammatory osteo-articular conditions, the purpose of this study is to determine the effects of RvD1 on RA onset and progression in vivo using a mouse model that shares many features with human RA as well as the molecular mechanism involved, using in vitro model.

MATERIALS AND METHODS

Materials

RvD1, LDH ELISA kit, and PGE₂ EIA kit were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). AMEM, RPMI 1640 1X medium, FBS, and antibiotics were purchased from Wisent Bio Products (Montreal, QC, Canada). LPS (E. Coli 0111:84), RANKL, M-CSF, TRAP staining kit, and mouse anti- β -actin antibody were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). MTS assay kit was purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA). Primary antibodies against mouse-TRAP and cathepsin K, Von Kossa (calcium stain) kit, and rabbit polyclonal anti-Beclin-1 were obtained from Abcam Inc (Toronto, ON, Canada). Peroxidase IgG secondary antibody was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). TNF- α and IL-10 ELISA kits were purchased from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). Th17-6 plex cytokines assay kit was purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). CTX-II ELISA kit and anti-mouse FPR2 antibody were purchased from MyBiosource (San Diego, CA, USA). CTX-I EIA kit was purchased from Immunodiagnostic Systems Limited (Baldon, United Kingdom). Ficoll-Paque PLUS was obtained from GE Healthcare (Mississauga, ON, CA). Osteo Assay Stripwell plates were purchased from Corning Inc. (New York, NY, USA). Arthrogein-CIA Arthrogein Monoclonal Antibody was purchased from Chondrex (Redmond, WA, USA). FPR2 siRNA and scramble siRNA were purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA, USA).

Cell Culture

Murine macrophage RAW 264.7 (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured with AMEM/10% FBS and antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Primary human monocytes were isolated from whole blood obtained from healthy volunteers. Briefly, blood was centrifuged on a Ficoll-Paque density gradient, as described previously [25]. Isolated monocytes were then cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, and antibiotics. All donors provided written, informed consent for the use of their blood for research purposes. Experimental protocols were approved by the Research Ethics Board of the “Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal”.

Animals

Thirty 8-week-old female DBA/1J mice, weighing approximately 18-20 g, were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Animal handling and experimental procedures were conducted in compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. The experimental protocol was adapted from previously reported methods [26] and approved by the Animal Research Ethics Committee of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal.

Viability Assay and LDH Release

RAW 264.7 cells were cultured as described above then seeded in a 96-well plate at 4×10^4 cells/well then treated with RvD1 (0-500 nM) with or without LPS (50 ng/ml) for 48 h. Cell viability and LDH release were assessed with commercial kits under the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 590 nm with EL800 universal micro-plate readers (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

TRAP Staining

RAW 264.7 cells were cultured as described previously, seeded in chambered cell culture slides at 8×10^4 cells/well, and transfected or not with 100 nM FPR2 siRNA or scramble siRNA. Osteoclast formation was induced by treatment of cells with LPS (50 ng/ml) \pm RvD1 (0-500 nM) for 72 h. TRAP staining performed as recommended by the manufacturer. Nuclei were counter stained with Gill's hematoxylin and TRAP positive multinucleated osteoclasts staining (≥ 3 nuclei) was counted in 10 randomly selected high-power fields using digital EVOS light microscopy (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) at 20X magnification.

Western Blot

RAW 264.7 cells were seeded in a 24-well plate at 2×10^5 cells/well then treated with RvD1 (0-500 nM) with or without LPS (50 ng/ml) for 72 h. $\sim 20 \mu\text{g}$ total proteins were loaded onto a 4-12% gradient SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). The primary antibodies were: anti-

mouse TRAP, anti-mouse cathepsin K, anti-mouse beclin-1, anti-FPR2, and anti-mouse β -actin primary antibodies. Revelation of immunoreactive bands and semi-quantitative analysis were performed as described in our previous report [24]

TNF- α , IL-10, PGE₂, RANK quantification in cell culture supernatant

TNF- α , IL-10, and RANK levels were assessed in cell culture supernatants by ELISA and PGE₂ level was determined by EIA, according to the manufacturer instructions. All assays were performed in duplicate. The absorbance was quantified with the micro-ELISA Vmax photometer at 405 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Hydroxyapatite Resorption Assay Pit Formation Assay

Mononuclear cells were seeded in an Osteo Assay Stripwell plate at 5×10^5 cells/well and allowed to adhere (2 h at 37°C) in RPMI/10% FBS in a humidified atmosphere and 5% CO₂. The nonadherent cells were removed by vigorous washes with PBS and adherent cells (mainly monocytes/macrophages) were cultured in RPMI/10% FBS containing 10 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml sRANKL. They were concurrently treated with increasing concentrations of RvD1 (0-500 nM) over two weeks. The culture medium was renewed every 3 days.

The resorption area in each plate was analyzed by Von Kossa staining following the manufacturer's instruction, then visualized and measured in 10 randomly selected high-power fields using digital EVOS light microscopy at 20X magnification.

Bone Resorption *in Ex-Vivo* Model

Bone explants from normal mice knee joints were rinsed in PBS containing antibiotics and cultured in BGJb medium supplemented with 20% FBS and antibiotics. Samples were treated or not with 10 ng/ml of M-CSF and 50 ng/ml of RANKL for 28 days in the presence or absence of 500 ng/ml RvD1. Culture medium were renewed 2 times per week. Bone histomorphometry was performed as described in our previous report [27] by measuring bone surface (μm^2) and marrow cavity area (μm^2).

Collagen Antibody Induced Arthritis (CAIA)

Arthritis was induced using an arthritogenic cocktail of five monoclonal antibodies anti-type II collagen (mAb) combined to LPS as previously describe [26]. Briefly, on day 1, mice were immunized by an intra-peritoneal (i.p.) injection of 1.5 mg of mAb, followed on day 4, by an i.p. injection of 50 µg of LPS (E. Coli 0111:84). Mice were monitored daily for body weight and disease scoring, and then sacrificed on day 10. Animals were randomly separated into 6 groups: Group 1 non-immunized mice; Group 2: CAIA mice, Groups 3-5 CAIA mice received a daily i.p. injection of 100, 500, and 1000 ng RvD1 since day 1, respectively; Group 6 CAIA mice received a daily i.p. injection of 1000 ng RvD1 from day 4. Groups 1 and 2 were given a saline solution with 0.1% EtOH instead. On day 10, mice were anesthetized by isoflurane inhalation, and blood was collected by cardiac puncture and then euthanized. Serum samples were stored at -80°C and knees and ankles were conserved in formalin until analyzed.

Clinical Evaluation of Induced Arthritis

Arthritis onset and progression were monitored daily by recording hind paw thickness using a caliper, arthritic score, and body weight, by two independent observers blinded to treatment groups. The arthritic score was graded using a 4-point clinical index for each paw, based on macroscopic signs (0 = no evidence of inflammation; 1 = inflammation (swelling and/or redness) in one joint; 2 = inflammation in two joints; 3 = inflammation in more than two joints; and 4 = severe arthritis of the entire paw and joints) as described by Lee et al. [28], for a total score of 0-16 for all four paws.

Serum Inflammatory Mediator's Determination

TNF- α , IL-17, IL-1 β , IL-6, and IFN- γ were quantified in serum using a convenient bioplex kit assay, according to the manufacturer's instructions. The concentrations of cytokines were measured using Bio-Plex™ 200 System instrument (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and Bio-Plex manager 4.1 Software.

Bone and Cartilage Remodeling Assessment

CTX-I and CTX-II, were quantified in mice serum by an EIA and ELISA kit, respectively, under the manufacturer's instructions. The sensitivity of each kit is 4.5 and 10 pg/ml, respectively, and the absorbance was measured at 450 nm with EL800 universal micro-plate readers (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Histopathology Study

Histopathologic sections of the knees were prepared following a conventional histopathologic processing of fixation, decalcification and paraffin embedding, as we previously reported [29]. The joints sections were stained with Safranin-O to assess cartilage degradation. Cartilage destruction was evaluated by two blinded observers, as described in detail in [29] using a previously described scoring system [30]. Osteoclast recruitment and activation were revealed by TRAP staining, as described in "TRAP staining" section. Cell proliferation in synovial membrane was performed by hematoxylin and eosin staining.

Micro-CT (μ -CT) Analysis

After the sacrifice, the ankles from each mice group were fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h and placed in PBS for 3-dimension (3D) μ -CT analysis. Each sample was scanned using Skyscan 1176-High Resolution in vivo X-ray Microtomography (Bruker-MicroCT, Kartuizer Weg 3B, Kontich 2550, Belgium) at 50 kVp and 500 μ A [26]. The 3D reconstruction was carried out using NRecon software, and the images were then after processed with μ -CT analyzer software.

Statistics

All experiments were at least triplicated. Means comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) with appropriate post-hoc analysis or 2-way ANOVA with repeated measures where appropriate. Data are expressed as mean \pm S.E.M. p-values <0.05 were regarded as significant.

RESULTS

RvD1 does not affect murine RAW 264.7 macrophages viability.

We first evaluated the potential toxicity of RvD1 in murine RAW 264.7 macrophages by performing an MTS assay. In contrast to H₂O₂, RvD1 did not alter the cell viability and LDH release after 48 h of incubation at tested doses ranging from 0 to 500 nM (Figs. 1A and 1B). Finally, the expression of Beclin-1, which is regulated in autophagy programmed cell death [31], was also unaffected by RvD1, in the presence or absence of LPS (Fig. 1C). Together, these data suggest that RvD1 does not affect cell viability.

RvD1 attenuates osteoclast differentiation and inflammatory mediator expression in RAW264.7 macrophages.

Here, we evaluated the impact of RvD1 treatment on RAW 264.7 macrophages-LPS-derived osteoclasts, by measuring their phenotypic markers, namely TRAP and cathepsin K. Western blot data show a strong inhibition of LPS-induced TRAP and cathepsin K expression by RvD1 at different concentrations (Fig. 2A) as well as TRAP activity and osteoclast differentiation (3 to 4-fold of inhibition, $p < 0.05$, Fig. 2B). Interestingly, down regulation of FPR2 expression by a specific siRNA abrogated the inhibitory effect of RvD1 as compared to LPS and LPS + scrambled (Sc) control siRNA (Fig. 2B). Of note, cell viability of transfected RAW264.7 with FPR2 siRNA or Sc siRNA was not affected and reached ~90-95% in comparison to untransfected cells.

We next investigated the anti-inflammatory of RvD1 in RAW 264.7 macrophages-LPS-derived osteoclasts. When used alone, RvD1 does not affect PGE₂, TNF- α , IL-10 releases neither RANK expression (Figs. 2C-2F). In contrast, RvD1 significantly reduces LPS-induced PGE₂, TNF- α , and RANK expression in a dose-dependent manner. At 500 nM, RvD1 significantly decreased LPS-induced PGE₂, TNF- α , and RANK by 3 to 4-fold (Figs. 2C, 2D, and 2F $p < 0.001$). In contrast, IL-10 level is significantly enhanced in RvD1-treated cells during LPS-induced osteoclast differentiation (Fig. 2E, $p < 0.0001$). Together, these results suggest that RvD1 inhibits osteoclast differentiation and activation, therefore reducing their pro-inflammatory mediator releases.

RvD1 prevents bone erosion using primary human monocyte-derived osteoclasts.

Next, we studied the effects of RvD1 on resorptive activity of human monocyte-derived osteoclasts. As shown by Von Kossa staining, a significantly higher erosion surface is observed when cells were M-CSF/RANKL (R-M)-differentiated when compared to control, while RvD1 at 500 nM drastically reduces hydroxyapatite matrix erosion to almost background level ($p < 0.01$, Fig. 3A). RvD1 at 100 and 1000 nM inhibits bone resorption in a similar pattern (data not shown). Interestingly, FRP2 silencing by siRNA abolished the inhibitory action of RvD1 ($p < 0.05$).

Then after, additional experiments were conducted using whole mouse femoral bone cultured during 4-weeks. The addition of 500 nM RvD1 reverses bone resorption induced by the R-M treatments to almost baseline level, as observed by hematoxylin and eosin staining (Fig. 3B, $p < 0.05$). This observation is sustained by a reduction in marrow cavity area and an increase in bone surface. Collectively, these data clearly demonstrate the pro-resolutive and antiresorptive potential of RvD1 on osteoclasts differentiation *in vitro* and *in ex vivo*.

RvD1 improves RA clinical endpoints in arthritic mice.

As expected, CAIA mice develop arthritis on day 4 and exhibit maximum inflammation between days 7 and 10 which was reflected by an increased arthritic score and swelling of paws as well as concomitant weight loss (Figs. 4A-4C). All RvD1 treatment groups exhibit a reduced arthritic score when compared to CAIA group ($p < 0.05$, Fig. 4A). Moreover, RvD1 mice had a lesser hind paw thickness over the disease period and reached a maximum effect at the end of the experiment (30% compared to CAIA group, $p < 0.05$, Fig. 4B). Furthermore, CAIA mice exhibit a trend toward weight loss over the disease period as compared to normal mice, with significant (up to 16%) weight loss at the end of the experiment. RvD1 treatment at 500 ng protected the mice from weight loss and reaches a maximum effect at day 10 (30% less than CAIA mice, $p < 0.05$, Fig. 4C). However, no significant differences were found in the measured parameters when 1000 ng RvD1 were given at day 4. Altogether, these findings underscore the clinical therapeutic potential of RvD1 for arthritis management. They indicate that

RvD1 treatment clearly alleviates RA main clinical endpoints, suggesting that RvD1 effectively delays RA onset, progression, and severity in an arthritic mouse model.

RvD1 attenuates synovial proliferation and bone resorption in arthritic mice

This part of the experiment was designed to verify the ability of RvD1 to attenuate histological changes in bone and synovial membrane. As shown in Figure 4D, RvD1 slightly reduced cell proliferation in synovium and strongly inhibited osteoclasts recruitment and activation in arthritic mice. Taken together, these data confirm the *in vitro* findings and indicate the biological efficacy of RvD1 in suppressing bone and joint damage.

RvD1 prevents cartilage degradation in knee joints of arthritic mice.

As expected, knee sections from RA mice show signs of histopathologic changes, such as fibrillation with loss of chondrocytes and proteoglycans, as compared to control mice (CTL) (Fig. 5A). In contrast, daily RvD1 treatment (100 and 500 ng) of the arthritic mice significantly reduced cartilage destruction and prevented chondrocytes and proteoglycan loss, when compared to RA, suggesting that RvD1 preserves normal homeostasis of the knee joint. Similar findings were obtained in animals treated with 1000 nM RvD1 given at day 1 and 4 (data not shown). These results are coherent with the arthritic score and the thickness of the paw that were measured.

RvD1 inhibits bone destruction in RA mice

We next investigate the ability of RvD1 to prevent bone loss in our RA mice model using μ CT imaging. μ CT analyses of the ankles from control, RA mice, and RA mice treated with RvD1 were performed in order to obtain a detailed image of the eroded mineralized bone tissues. As illustrated in Figure 5B, the intraperitoneal injection of 500 ng of RvD1 results in a marked reduction of bone erosion across several tarsal bones, as compared to RA mice ankles. These results suggest that RvD1 treatment prevents bone erosion *in vivo* as our results *in vitro*.

RvD1 reduces serum markers of cartilage and bone damage.

In order to evaluate by which mechanism RvD1 prevented bone erosion, we investigated the effect of RvD1 administration on the expression of bone destruction markers in RA mice model. First, our data indicated that RvD1 level increased in serum from RA mice and its administration at different doses enhanced its serum biodisponibility (Fig. 5C). Second, our findings revealed that RvD1 significantly reduced serum cartilage degradation markers, such as CTX-II (Fig. 5D), and serum bone resorption markers, such as CTX-I and TRAP (Figs. 5E and 5F), as compared to RA mice. Together, these findings suggest the protective effect of RvD1 against cartilage and bone destruction in RA disease and possibly in other bone and joint-related disorders.

RvD1 attenuates inflammatory mediators in arthritic mice serum.

This part of our study was designed to investigate the anti-inflammatory effect of RvD1 in the CAIA mouse model. As shown in Figure 6, RvD1 significantly down regulates the production of the most important inflammatory mediators playing crucial roles in RA. In fact, RvD1 given at 100 ng at day 1 and 4 significantly inhibits serum levels of inflammatory cytokines such as TNF- α (Fig. 6A, $p < 0.01$), IL-17 (Fig. 6B, $p < 0.001$), IL-1 β (Fig. 6C, $p < 0.01$), IL-6 (Fig. 6D, $p < 0.01$), IFN- γ (Fig. 6E, $p < 0.01$), and PGE₂ (Fig. 6F, $p < 0.01$) by nearly 50% compared to CAIA group. Altogether, these findings confirm our expectations that RvD1 exerts an anti-inflammatory action in arthritic mice.

DISCUSSION

As a chronic autoimmune inflammatory condition, RA has been extensively studied. The well-defined and consistent impairment in all RA patients is the severe joint dysfunction, associated with synovial inflammation, cartilage degradation, as well as osteoporosis [32]. At present, even if some treatments have improved RA therapy, they are still erratic and can cause notable side effects to the patient [33]. Finding a novel therapy could potentially enhance patient quality of life.

In this perspective, we studied an alternative approach for RA therapy using RvD1. RvD1 is an important factor in the resolution phase of inflammation, with well-known pro-resolving and anti-inflammatory properties. We have demonstrated that RvD1 is higher in inflammatory conditions [24], probably in an attempt to reduce the inflammation as an endogenous mechanism. Herein, we describe promising results about the contribution of RvD1 in improving RA symptoms and support the notion that RvD1 prevents arthritic joint disorders, caused by excessive cartilage degradation and bone resorption.

We initially studied the effects of RvD1 on macrophages and osteoclasts, which are key players in promoting and expanding inflammation in RA joint tissues. Macrophages play a pivotal role in promoting and maintaining RA pathogenesis. In concert with chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes, they drive cartilage catabolism through the release of catabolic and inflammatory factors. Here, we demonstrated in vitro that RvD1 significantly inhibited osteoclast differentiation and activation as well as the release of pro-inflammatory mediators. In contrast, IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was up-regulated. Besides, the osteoclasts inhibition by RvD1 treatment was associated with TRAP and cathepsin-K inhibition. Cathepsin-K actions are crucial in normal skeletal physiology [6] and have been implicated in bone and cartilage pathological degradation [34]. In fact, overexpressing cathepsin-K in mouse has led to synovitis, as well as cartilage and bone destruction, similar to the manifestation of RA [35]. Otherwise, it has been established that RA serum and synovial fluid present high levels of IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α , as well as cathepsin-K, which triggers osteoclast differentiation and activation in the early phases of the disease [36]. Consistent with our findings, results have indicated that RvD1 reduces osteoclastogenesis through inhibition of the dendritic cell-specific transmembrane protein expression which is essential for cell fusion during osteoclastogenesis [37].

Likewise, DHA showed significant inhibitor effects on osteoclastogenesis, which was reversed by LOX inhibition, suggesting that DHA properties are essentially mediated by RvD1 [37, 38]. Similarly, Boeyens et al. indicated that RANKL-induced and DHA-treated RAW264.7 cells showed suppressed expression of cathepsin-K and TRAP [39]. Moreover, Gu et al. showed that RvD1, in addition to other resolution mediators is a strong inhibitor of pro-inflammatory cytokines produced by monocytes in response to stimulation with LPS [40], while Hsiao et al. suggested that RvD1 increased IL-10 levels in smoke-exposed mice lungs [41].

In the present study, we also put special emphasis on the potential of RvD1 to prevent bone erosion. Our results demonstrated that RvD1 strongly inhibited hydroxyapatite matrix degradation induced by RANKL + M-CSF using human primary monocytes. Indeed, many authors have reported that TRAP and cathepsin K-positive osteoclasts are largely found in areas of pannus invasion into bone in RA [5, 42, 43]. Bone damage arises from complex interactions involving osteoclast maturation, mainly mediated via RANKL, M-CSF, and TNF- α pathways [44]. It has been established that RvD1 and its aspirin-triggered epimer switch gene regulation profiles from M1-type pro-inflammatory macrophages into M2-type pro-resolution macrophages involved in homeostasis and bone repair [45, 46]. Hence, our findings contribute to the data dealing with the potential of RvD1 in bone protection.

Furthermore, in order to harness and clarify our findings, we focused on analyzing the involvement of FPR2/ALX receptors in RvD1 effects. Our results demonstrated that FPR2/ALX silencing inhibited RvD1 effects and led to significant osteoclasts differentiation as well as important hydroxyapatite matrix erosion, suggesting that RvD1 exerts its actions in part by interacting with FPR2/ALX receptors. These findings are consistent with the literature data indicating that RvD1 actions are mediated by two GPCRs, FPR2/ALX and GPR32 [47]. In fact, Krishnamoorthy et al. have shown that in self-limited peritonitis, RvD1 treatment reduced neutrophil infiltration in human FPR2/ALX-overexpressing transgenic mice, while this effect was not observed in FPR2/ALX knockout mice [48].

In an attempt to refine the *in vivo* effect of RvD1, another set of experiments was conducted using CAIA mouse model. Our findings showed that daily administration of

RvD1 provides its serum bioavailability that is consistent and predictable at every dose. As expected, the arthritic group displayed significant swelling and redness of paws as assessed by macroscopic clinical evaluation and also showed high levels of inflammatory mediators in mice serum. Whereas, daily treatment with RvD1 reduced paw swelling and redness and limited mice weight loss. More importantly, RvD1 strongly reduces TNF- α , IL-17, IL-6, IL-1 β , IFN γ as well as PGE₂, in mice serum. TNF- α , IL-17 and IL-6 have been shown to be closely correlated with RA activity [36], and IL-1 β involved in cartilage degradation [44].

In accordance with these effects, RvD1 reduced synovial proliferation, osteoclasts recruitment, and cartilage destruction in RA mice as depicted by the histological examination. Interestingly, the protective effect of RvD1 in cartilage and bone was confirmed by the decrease of serum levels of their respective biomarkers, namely CTX-II and CTX-I. Additional findings were obtained on bone resorption, as indicated by μ -CT analysis. Our findings support previous data on cartilage and bone metabolism. In chondrocytes, we demonstrated that RvD1 protects cartilage from degradation and preserves its homeostasis by inhibiting IL-1 β -induced matrix metalloproteinase-13 production in human chondrocytes [24].

Additionally, a significant amount of evidence revealed the presence of resolvins, in addition to FPR2/ALX in RA synovial tissues [10, 49, 50]. The interest for RvD1 in general, seems not only due to its potential to neutralize inflammatory and catabolic tissue insults, but also because of increasing data showing that it has the ability to repair injured tissues and most importantly to promote their regeneration. In the context of RA, Norling et al. [10] provided promising finding on RvD1 and its aspirin-triggered epimer. They identified its remarkable efficiency to relieve arthritis symptoms in the K/BxN mouse model. Furthermore, they identified the potential of RvD1 for chondroprotection since it promotes direct cartilage anabolic responses in vitro. Their findings are highly valuable and contribute to the advancement of knowledge on RvD1 and most importantly on how it could be beneficial for RA therapy. The ultimate objective being to build as complete knowledge as possible on a very promising therapy for inflammatory osteoarticular diseases, our study aimed to expand the knowledge by addressing other facets of RvD1 in other important hallmarks of RA. We showed that RvD1 preserves

joint structure and prevents bone destruction and erosion by inhibiting osteoclast recruitment.

CONCLUSION

In conclusion, the present study demonstrates that RA is indeed positively affected by RvD1 and contributes to other studies clarifying the implication of RvD1 in improving signs and symptoms of RA. This lends support to the notion that RvD1 acts as a potent resolution mediator to control arthritis inflammatory manifestations and may hold promise for use as a potent agent in RA therapy.

Ethics approval and consent to participate

The local ethics committee of “ Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal ” and The Research Centre of the “ Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal ” approved the study in human and in animal, respectively. Informed consent was obtained from all participants

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author, after permission of the research centre of the hospital du sacré-Coeur de Montreal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests and approved the final version of the manuscript

Funding

This work was supported by the “Fonds de recherche en orthopédie, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal” (grant to Dr Mohamed Benderdour, and by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MOP-130293 (to Dr. Hassan Fahmi).

Authors' contributions

HAB performed the experimental study, contributed to preparation of the manuscript and undertook the statistical analysis. MK & PER assisted in the experiments and in the cell culture and treatment. QS, HF, FV and JCF evaluated and interpreted the data and assisted with preparation of the manuscript. MB designed the study, supervised the project, evaluated and interpreted the data, and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Miss Courtney Stapleton for English language editing. We thank Miss Irene Londono for her technical assistance for μ -CT analyses.

Abbreviation

CTX-I = C-terminal telopeptide type II collagen; CTX-II = C-terminal telopeptide type II collagen; IL = Interleukin; IFN- γ = Interferon-gamma; LDH = Lactate Dehydrogenase; Lipopolysaccharide (LPS); M-CSF = Macrophage Colony-Stimulating Factor; NF- κ B = Nuclear Factor-kappa B; PGE₂ = Prostaglandin E2; RANKL= Receptor Activator of NF- κ B ligand; RvD1= Resolvin D1; RA : Rheumatoid Arthritis; TNF- α = Tumour Necrosis Factor alpha; TRAP = Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

REFERENCES

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2010; 376:1094-1108.
2. Fattahi MJ, Mirshafiey A. Prostaglandins and rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:239310.
3. Teng Y, Yin Z, Li J, Li K, Li X, Zhang Y. Adenovirus-mediated delivery of Sema3A alleviates rheumatoid arthritis in a serum-transfer induced mouse model. *Oncotarget*. 2017;8:66270.
4. Kiadaliri AA, Felson DT, Neogi T, Englund M. Brief Report: Rheumatoid Arthritis as the Underlying Cause of Death in Thirty-One Countries, 1987–2011: Trend Analysis of World Health Organization Mortality Database. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69:1560-1565.
5. Dharmapatni AA, Cantley MD, Marino V, Perilli E, Crotti TN, Smith MD, Haynes DR: The X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibitor embelin suppresses inflammation and bone erosion in collagen antibody induced arthritis mice. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:564042.
6. Sun P, Liu Y, Deng X, Yu C, Dai N, Yuan X, et al. An inhibitor of cathepsin K, icariin suppresses cartilage and bone degradation in mice of collagen-induced arthritis. *Phytomedicine*. 2013;20:975-979.
7. Liu Y, Lv J, Yang B, Liu F, Tian Z, Cai Y, et al. Lycium barbarum polysaccharide attenuates type II collagen-induced arthritis in mice. *Int J Biol Macromol*. 2015;78:318-23.
8. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:492-509.
9. Feldmann M, Maini RN. Perspectives from masters in rheumatology and autoimmunity: can we get closer to a cure for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:2283-2291.

10. Norling LV, Headland SE, Dalli J, Arnardottir HH, Haworth O, Jones HR, et al. Pro-Resolving and Cartilage-Protective Actions of Resolvin D1 in Inflammatory Arthritis. *JCI Insight*. 2016;1:e85922.
11. Klarenbeek NB, Güler-Yüksel M, van der Kooij SM, Han KH, Roday HK, Kerstens PJSM, et al. The impact of four dynamic, goal-steered treatment strategies on the 5-year outcomes of rheumatoid arthritis patients in the BeSt study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1039-46.
12. Woodworth TG, den Broeder AA. Treating to target in established rheumatoid arthritis: Challenges and opportunities in an era of novel targeted therapies and biosimilars. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2015;29:543-9.
13. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 2014;40:315-327.
14. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol*. 2010;177:1576-1591.
15. Perretti M, Cooper D, Dalli J, Norling LV. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 13:87-99.
16. Xu MX, Tan BC, Zhou W, Wei T, Lai WH, Tan JW, et al. Resolvin D1, an endogenous lipid mediator for inactivation of inflammation-related signaling pathways in microglial cells, prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19:235-43.
17. Corminboeuf O, Leroy X. FPR2/ALXR agonists and the resolution of inflammation. *J Med Chem*. 2014; 58:537-559.
18. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 2013;339:166-172.
19. Luo B, Han F, Xu K, Wang J, Liu Z, Shen Z, et al. Resolvin D1 programs inflammation resolution by increasing TGF- β expression induced by dying cell clearance in experimental autoimmune neuritis. *J Neurosci*. 2016;36:9590-9603.
20. Levy BD. Resolvins and protectins: natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010;82:327-332.
21. Titos E, Rius B, González-Pérez A, López-Vicario C, Morán-Salvador E, Martínez-Clemente M, et al. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid

- promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. *J Immunol.* 2011;187:5408-5418.
22. Xu ZZ, Ji RR. Resolvins are potent analgesics for arthritic pain. *Br J Pharmacol.* 2011;164:274-277.
 23. Oehler B, Mohammadi M, Perpina Viciano C, Hackel D, Hoffmann C, Brack A, et al. Peripheral Interaction of Resolvin D1 and E1 with Opioid Receptor Antagonists for Antinociception in Inflammatory Pain in Rats. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:242.
 24. Benabdoune H, Rondon EP, Shi Q, Fernandes J, Ranger P, Fahmi H, et al. The role of resolvin D1 in the regulation of inflammatory and catabolic mediators in osteoarthritis. *Inflamm Res.* 2016;65:635-645.
 25. Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Mineau F, Jolicoeur FC, Benderdour M, et al. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis rheum.* 2000;43:1134-1144.
 26. Shi Q, Rondon-Cavanzo EP, Dalla Picola IP, Tiera MJ, Zhang X, Dai K, Benabdoune HA, Benderdour M, Fernandes JC. In vivo therapeutic efficacy of TNF α silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:387-402.
 27. Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, Fahmi H, Fernandes JC, Benderdour M. Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. *J Cell Biochem.* 2011;112:107-117.
 28. Lee J, Hong EC, Jeong H, Hwang JW, Kim H, Bae EK, et al. A novel histone deacetylase 6-selective inhibitor suppresses synovial inflammation and joint destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Int J Rheum Dis.* 2015;18:514-523.
 29. Abusarah J, Benabdoun HA, Shi Q, Lussier B, Martel-Pelletier J, Malo M, et al. Elucidating the Role of Protandim and 6-Gingerol in Protection Against Osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2017;118:1003-1013.

30. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14:13-29.
31. Messer JS. The cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:1281-1296.
32. Hawtree S, Muthana M, Wilson AG. The role of histone deacetylases in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Biochem Soc Trans*. 2013;41:783-8.
33. Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Nam JL, Smolen JS, Buch M, Gossec L, et al. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:529-35.
34. Salminen-Mankonen H, Morko J, Vuorio E. Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. *Curr Drug Targets*. 2007;8:315-23.
35. Morko J, Kiviranta R, Joronen K, Saamanen AM, Vuorio E, Salminen-Mankonen H. Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3713-7.
36. Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2007;7:65-70.
37. Yuan J, Akiyama M, Nakahama Ki, Sato T, Uematsu H, Morita I. The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2010;92:85-90.
38. Kasonga AE, Deepak V, Kruger MC, Coetzee M. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid suppress osteoclast formation and activity in human CD14⁺ monocytes, in vitro. *PloS one*. 2015; 10:e0125145.
39. Boeyens JC, Deepak V, Chua WH, Kruger MC, Joubert AM, Coetzee M. Effects of ω 3-and ω 6-polyunsaturated fatty acids on RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264. 7 cells: a comparative in vitro study. *Nutrients*. 2014; 6:2584-2601.

40. Gu Z, Lamont GJ, Lamont RJ, Uriarte SM, Wang H, Scott DA. Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3 β anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes. *Innate immun.* 2016; 22:186-95.
41. Hsiao HM, Sapinoro RE, Thatcher TH, Croasdell A, Levy EP, Fulton RA, et al. A novel anti-inflammatory and pro-resolving role for resolvin D1 in acute cigarette smoke-induced lung inflammation. *PloS one.* 2013; 8:e58258.
42. Schett G. Autoimmunity as a trigger for structural bone damage in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2017;27:193-197.
43. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheumatol.* 2000;43:250-8.
44. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity.* 2017;46:183-196.
45. Kang JW, Lee SM. Resolvin D1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing M2 macrophage polarization and efferocytosis. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861:1025-1035.
46. Schmid M, Gemperle C, Rimann N, Hersberger M. Resolvin D1 polarizes primary human macrophages toward a proresolution phenotype through GPR32. *J Immunol.* 2016;196:3429-37.
47. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Fredman G, Serhan CN. Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs. *Am J Pathol.* 2012;180:2018-27.
48. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:1660-5.
49. Gheorghe KR, Korotkova M, Catrina AI, Backman L, Af Klint E, Claesson HE, et al. Expression of 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase in rheumatoid arthritis synovium and effects of intraarticular glucocorticoids. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R83.

50. Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, et al. Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2007 ;34:2144-53.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. RvD1 does not impair RAW264.7 cells viability. RAW264.7 cells were incubated with different concentrations of RvD1 (0-500 nM) without or with 50 ng/ml LPS for 72 h. Cell viability percentages were obtained by 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide assay **(A)** and LDH release was measured in cell supernatants by a commercial kit **(B)**. Cell death and LDL release were induced by the addition of 0.5 mM H₂O₂. Beclin-1 protein expression was assessed in cell extracts by western blot **(C)**. ANOVA test was performed to compare each condition. Results are expressed as mean \pm SEM for n = 4. Data are means \pm SEM and One-way ANOVA was performed to compare the results. ##p<0.01 compared to untreated cells.

Figure 2. RvD1 inhibits osteoclast activation and recruitment as well as LPS-induced TRAP, cathepsin-k, PGE₂, TNF- α , and RANK expression, and concurrently enhances IL-10 release in LPS-activated RAW 264.7 macrophages. Macrophages were stimulated with LPS (50 ng/ml) with or without RvD1 treatment (0-500 nM) for 72h. Cell extracts were collected, and then TRAP and cathepsin-k protein expression was assessed by western blot **(A)**. The same treatment was conducted after incubation or not of cells with sc-siRNA or siRNA against FPR2 (50 nM) for 24 h. TRAP enzymatic staining was performed and TRAP positive cells were observed with an inverted microscope (x200). Arrows show osteoclasts with 3 nuclei or more **(B)**. Western blot was employed to confirm FPR2 silencing by siRNA **(B)**. In parallel, cell media was collected and then PGE₂ **(C)**, TNF- α **(D)**, IL-10 **(E)**, and RANK **(F)** expression was assessed by commercial kits. Data are means \pm SEM for n=3 and One-way ANOVA was performed to compare the results. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 compared to non-stimulated cells; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 compared to LPS-activated cells.

Figure 3. RvD1 inhibits hydroxyapatite matrix degradation as well as bone resorption induced by primary human monocytes-derived osteoclasts. **(A)** Human monocytes were incubated on a hydroxyapatite matrix. They were first treated without or

with sc-siRNA or siRNA FPR2 (50 nM) for 24 h and then stimulated over two weeks with RANKL (50 ng/ml) and M-CSF (10 ng/ml) with or without RvD1 treatment (500 nM). Culture medium was changed every 3 days. Von Kossa staining was performed then pit areas were observed under inverted microscope (x200) and measured using ImageJ software. **(B)** Normal mouse femoral bone explants were incubated with RANKL (50 ng/ml) and M-CSF (10 ng/ml) with or without RvD1 treatment (100 or 500 nM) over 28 days. Culture medium was changed every 3 days. Hematoxylin-Eosin staining was performed and resorption areas were observed and scored under inverted microscope (x200). Data are means \pm SEM for n=3 and One-way ANOVA was performed to compare the results. ##p<0.01 compared to untreated cells; *p<0.05 compared to M-CSF/RANKL-activated cells; @p<0.05 compared to RvD1--stimulated cells.

Figure 4. RvD1 treatment improves RA clinical endpoints as well as synovium and bone changes in arthritic mice. Arthritis was induced by ip injection of arthritogenic cocktail of five monoclonal antibodies anti-type II collagen (mAb) on day 1, followed by ip injection of 50 μ g LPS on day 4, as described in methods. Over the course of the experiment, and for each of the experimental groups (non-immunized control mice, CAIA mice immunized with type II collagen antibody and treated with vehicle, and mice immunized with type II collagen and treated with RvD1 (100, 500, 1000 ng/day) at day 1 or with 1000 ng/ml at day 4, clinical score was attributed by two investigators blinded to groups on a scale of 0-4 for each paw, for a maximum of 16 for all four paws, as described in methods **(A)**. Hind paw thickness was measured using a caliper and expressed as thickness change from baseline **(B)**. Weight evolution was assessed and expressed as percentage of weight loss from baseline **(C)**. Data are means \pm SEM for n=6 and One-way ANOVA was performed to compare the results. *p<0.05, **p<0.01 compared to RA group. Cell proliferation in synovial membrane and TRAP staining in bone were performed as described in Material and Methods **(D)**.

Figure 5. RvD1 daily treatment prevents cartilage and bone alterations in arthritic mice joints. Arthritis was induced as previously described. After mice sacrifice, blood was collected. Knees and ankles were removed and then fixed and sectioned as described

in methods. Knee sections were stained with safranin-O staining and scored (**A**). Ankles were examined with a micro-CT scanner (**B**). Serum RvD1, TRAP, CTX-I, and CTX-II levels were assessed by EIA and ELISA, respectively (**C-F**). Data are means \pm SEM and One-way ANOVA was performed to compare the results. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$ compared to non-immunized group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to CAIA group. $n = 4-5$ mice per group. F = femur; T = tibia.

Figure 6. RvD1 daily treatment decreases inflammatory mediators release in arthritic mice serum. Arthritis was induced as previously described in figure 4. Blood was collected after mice sacrifice at day 10. Serum levels of inflammatory cytokines (**A-E**) as well as PGE₂ (**F**) were measured by multiplex and EIA assays respectively. Data are means \pm SEM. One-way ANOVA was performed to compare the results. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to CAIA group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ compared to non-immunized group. $n = 4-5$ mice per group.

Figure 1

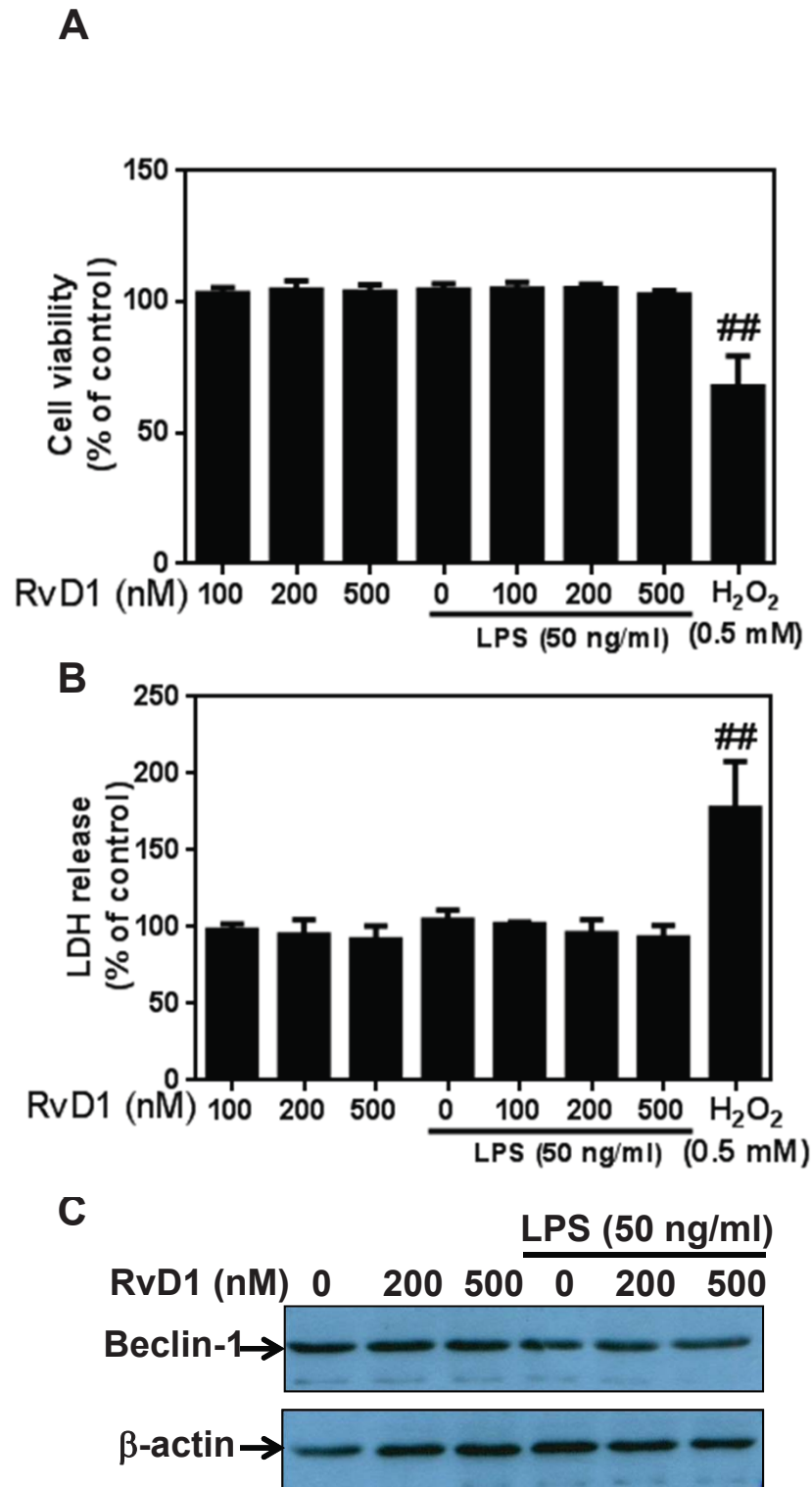


Figure 2

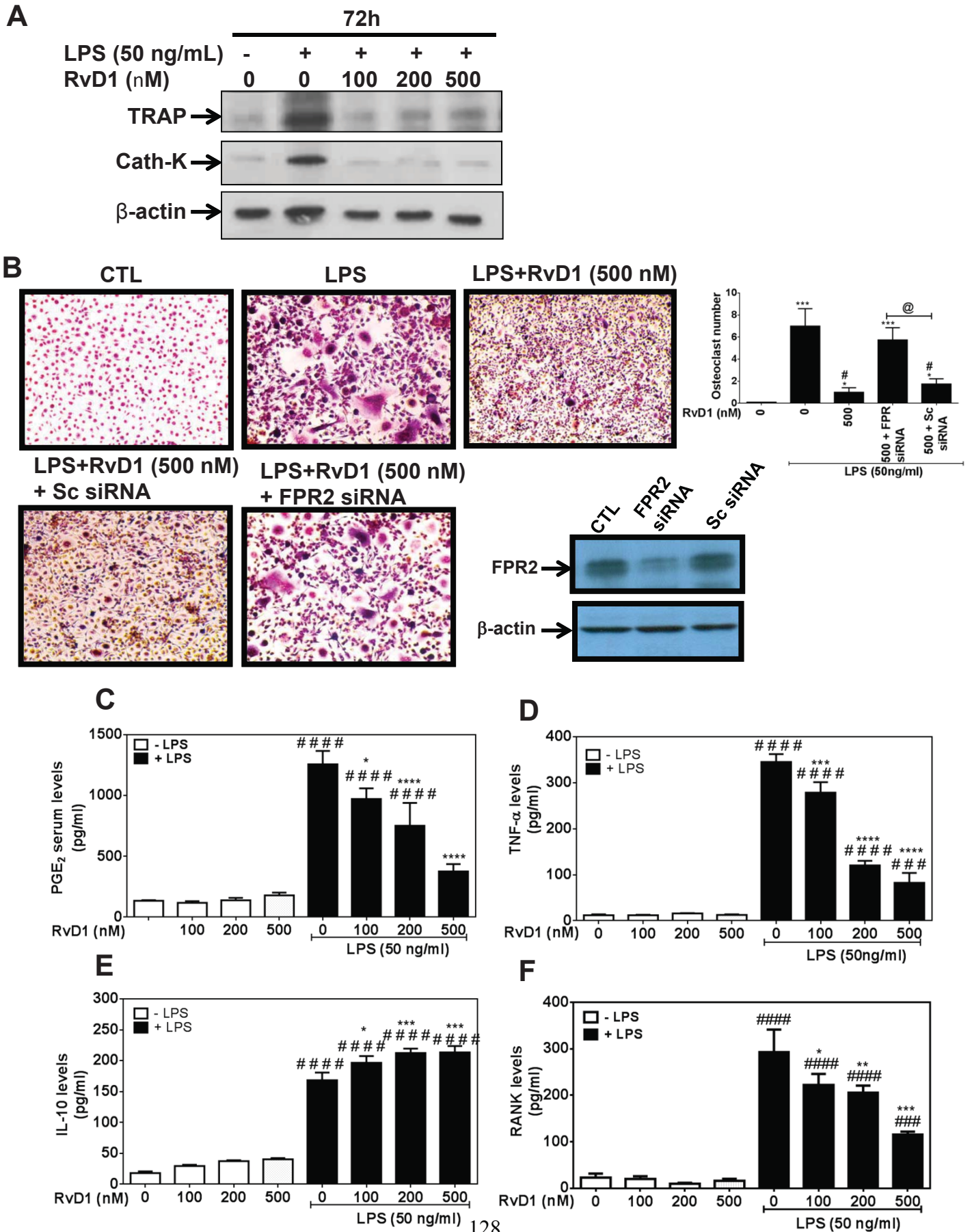


Figure 3

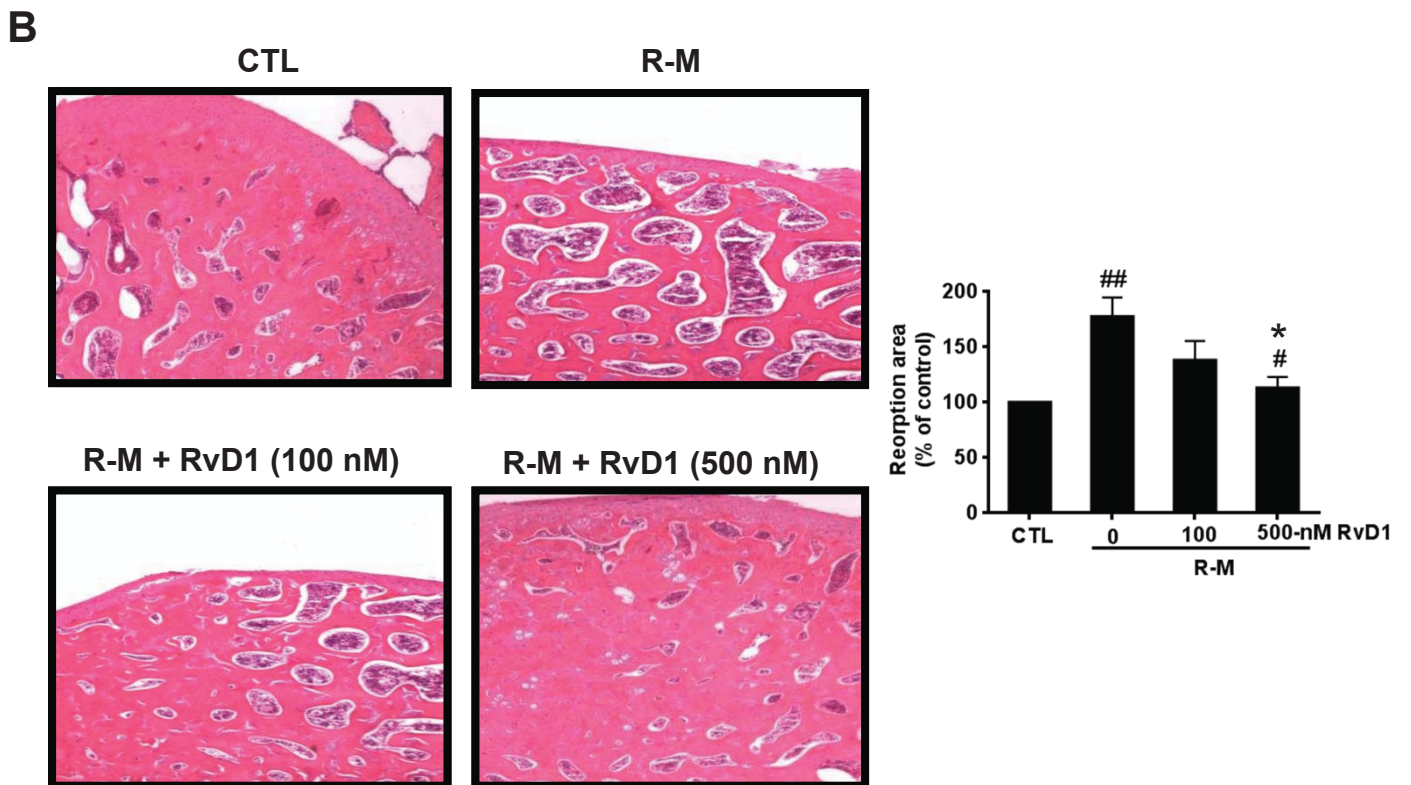
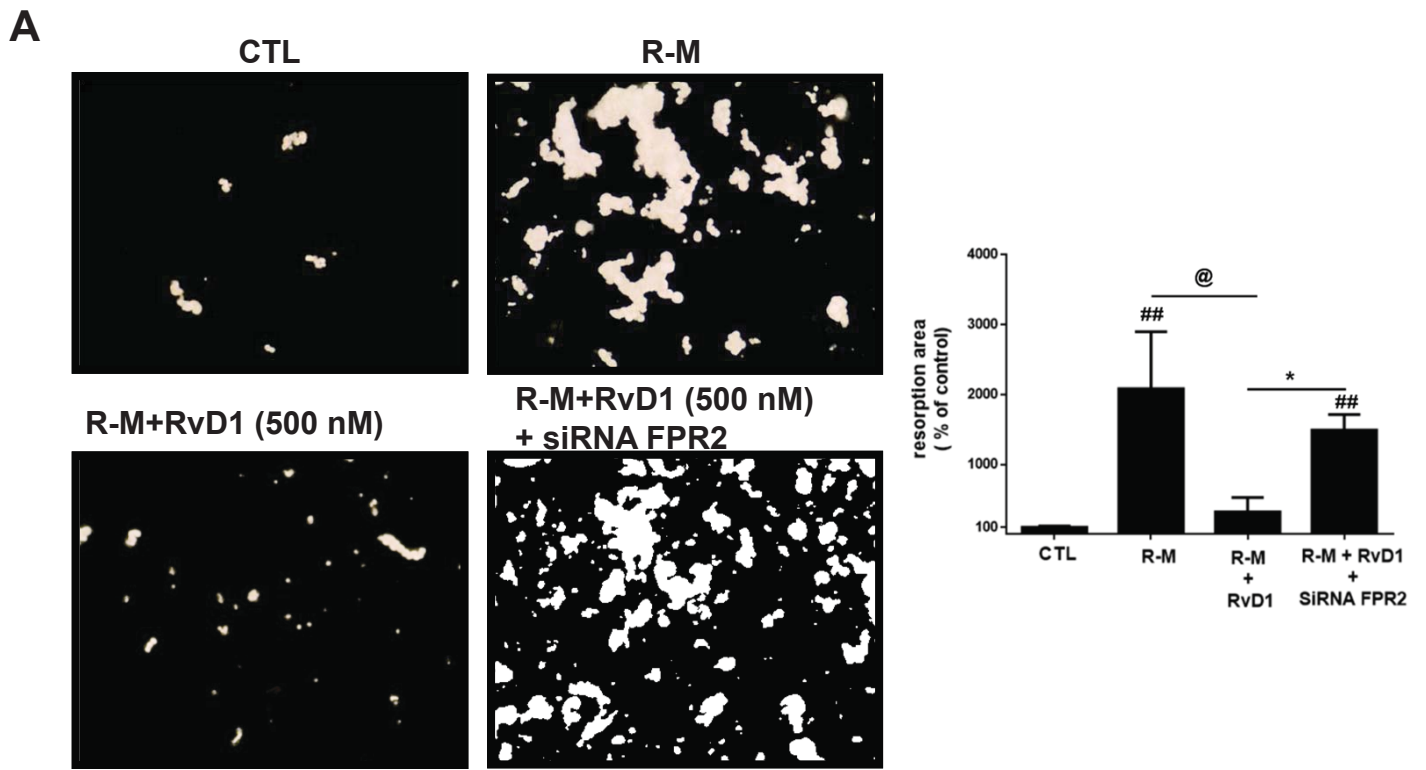


Figure 4

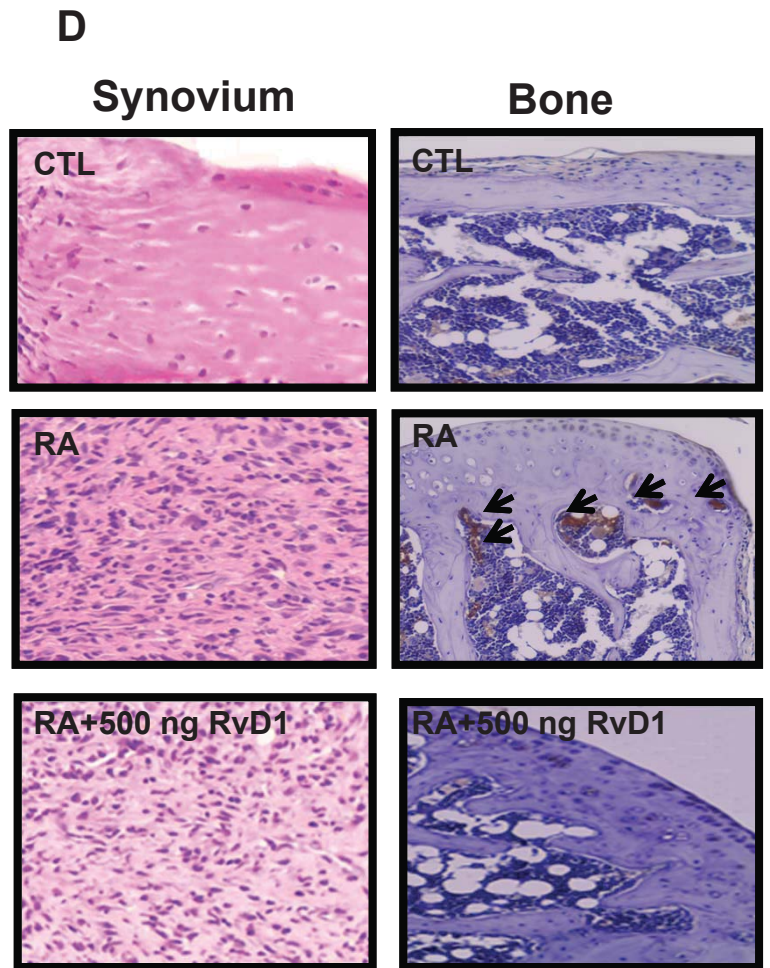
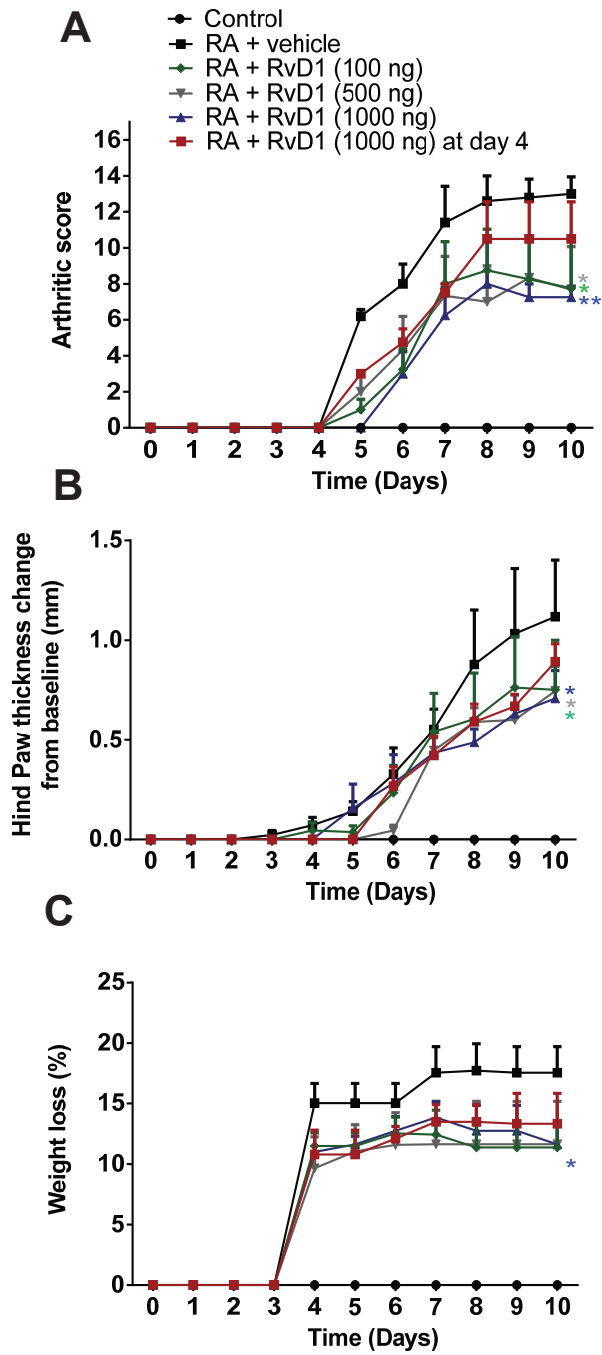


Figure 5

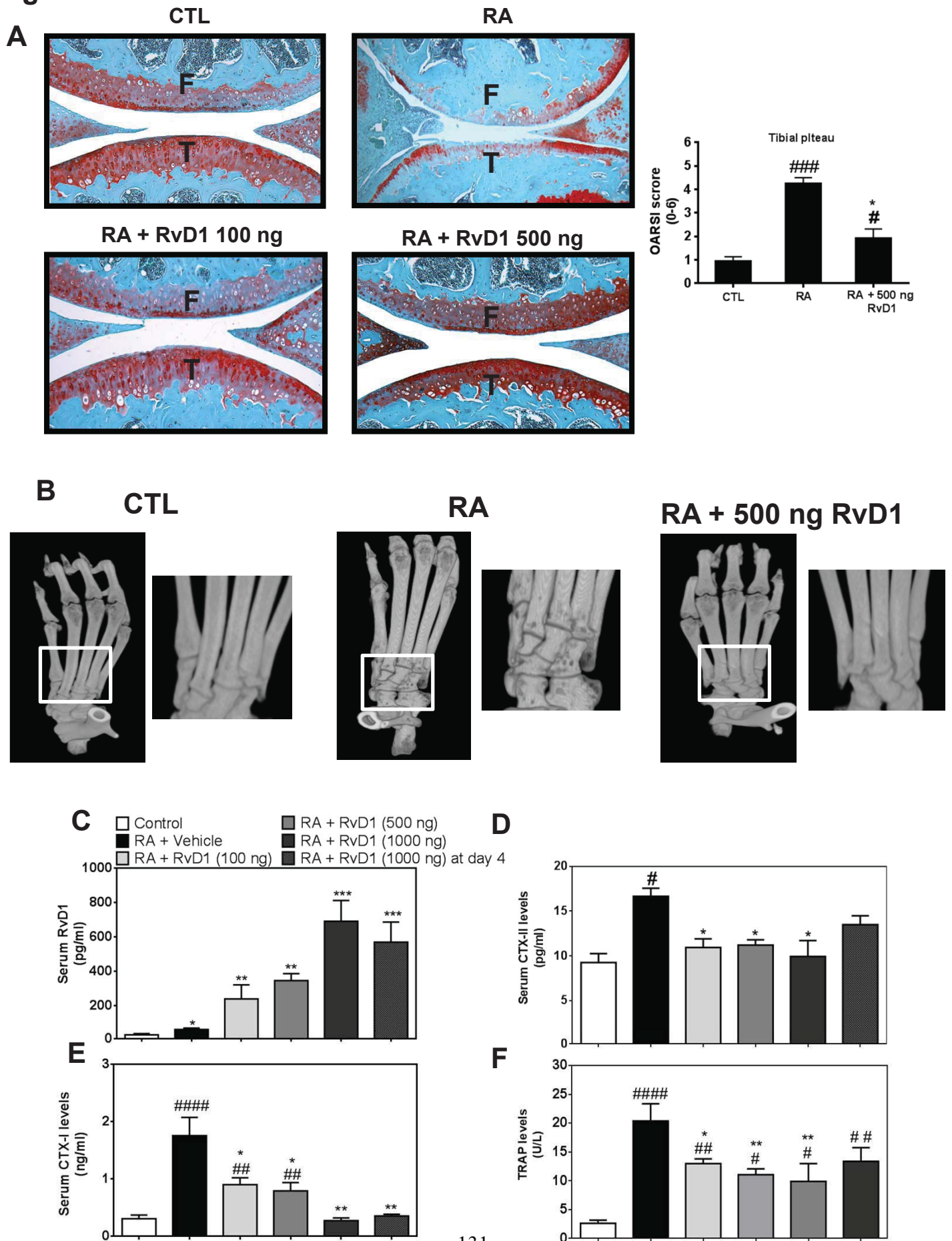


Figure 6

